



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Estudo de parâmetros entomológicos com importância para a
transmissão de malária por *Anopheles gambiae* s.l. na Guiné-Bissau**

José Luis Cravo Vicente

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA

OUTUBRO, 2014



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Estudo de parâmetros entomológicos com importância para a
transmissão de malária por *Anopheles gambiae* s.l. na Guiné-Bissau**

José Luis Cravo Vicente

Orientador:

Prof. Doutor João Pinto (UEIPM/IHMT/UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

AGRADECIMENTOS

A realização deste mestrado não teria sido possível sem a colaboração de pessoas e entidades que direta ou indiretamente me apoiaram ou colaboraram na execução das várias tarefas deste estudo, às quais quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. João Pinto, pela orientação prestada neste trabalho e pela confiança, estímulo e apoio que sempre me prestou. A sua disponibilidade e paciência para atender às minhas dúvidas e questões contribuiu de uma forma fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Almeida, pelo seu incentivo e por me ter dado a oportunidade de realizar este mestrado na UEI Parasitologia Médica no grupo de Entomologia Médica.

Aos restantes professores do grupo de Entomologia Médica, em particular à Prof. Dra. Carla Sousa, pelo apoio, entusiasmo, simpatia e também pela constante disponibilidade em me ajudar e ensinar sempre que solicitado.

Ao Instituto Nacional de Saúde Pública (INASA, Guiné Bissau) e nomeadamente à Dra. Amabélia Rodrigues pelo apoio que nos foi dado durante a estadia na Guiné-Bissau.

À Prof. Dra. Alessandra della Torre, Beniamino Caputo e Marco Pombi da “Università di Roma - La Sapienza” e ao técnico João Dinis, do INASA, pela colaboração nas colheitas de material durante o trabalho de campo e pela simpatia, companheirismo e amizade demonstradas.

Um enorme obrigado aos meus colegas de laboratório, Bruno Gomes, Eliane Arez, Gonçalo Seixas, Patrícia Salgueiro, Teresa Nazareth e Vasco Gordicho. Foram incansáveis no apoio e motivação, estiveram sempre presentes e permitiram-me que os chamasse de amigos, apesar de em alguns casos, não possuírem o melhor discernimento para a escolha de simpatias clubísticas.

Não menos importante, todos os restantes amigos com quem me cruzei neste (já longo) percurso no IHMT, obrigado por toda a ajuda e ensinamentos que foram certamente muito úteis na execução deste trabalho e com a sua boa disposição tornaram este período muito mais divertido e estimulante.

À Cristina e à Madalena, por me aturarem, por estarem sempre presentes, por todo o ânimo e apoio nesta fase do meu percurso profissional e por tudo o que significam para mim.

Este trabalho teve ainda o apoio dos projetos: i) Especiação com fluxo genético e genes de isolamento no mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Ministério da Educação e Ciência (PTDC/BIA-EVF/120407/2010) e ii) INFRAVEC: “Research capacity for the implementation of genetic control of mosquitoes”. FP7-INFRASTRUCTURES-2008-1/EU (GA nº 228421), no âmbito dos quais tive a oportunidade de colaborar como bolseiro e que permitiram a concretização deste mestrado.

RESUMO

Estudo de parâmetros entomológicos com importância para a transmissão de malária por *Anopheles gambiae* s.l. na Guiné-Bissau

José Luis Cravo Vicente

Na Guiné-Bissau, algumas das descrições efetuadas sobre a distribuição das espécies do complexo *Anopheles gambiae* são anteriores à distinção entre formas moleculares e, em estudos mais recentes, esta caracterização é maioritariamente efetuada na região litoral pelo que as possíveis diferenças associadas à transição entre biótopos se encontram por clarificar. Nesta região, verificam-se também, elevadas taxas de hibridação entre *A. gambiae* e *A. coluzzii* sugerindo a ocorrência de uma zona de contato secundário.

Assim, o estudo da distribuição das espécies do complexo *A. gambiae* e a extensão geográfica onde ocorrem híbridos torna-se relevante, já que as várias espécies possuem diferentes padrões comportamentais e, por estarem adaptadas a diferentes biótopos, influenciam os padrões de transmissão de malária, a dispersão de genes de interesse, bem como a aplicação de estratégias de controlo vetorial.

Efetuaram-se colheitas entomológicas de mosquitos adultos num transeto Este-Oeste, percorrendo diversos biótopos na Guiné-Bissau. A identificação molecular das espécies foi realizada com recurso aos marcadores IGS e SINE. Foram pesquisadas mutações *kdr* (L1014S e L1014F) e a mutação G119S no gene *ace-1*. Foram ainda determinados índices de antropofilia e taxas esporozoíticas de *Plasmodium falciparum*, com recurso a técnicas de ELISA.

Na amostra total, *A. gambiae* foi a espécie mais abundante (50%), sendo a mais frequente nas regiões litoral e interior. *Anopheles coluzzii* foi a segunda espécie mais abundante (23%), predominando na região central. Observou-se uma frequência elevada de híbridos (21%) em particular na região litoral, confirmando estudos anteriores. *Anopheles melas* e *A. arabiensis* foram também identificados, com frequências bastante inferiores, 5% e 1%, respetivamente. A presença de *A. arabiensis* na região litoral é um novo achado, podendo representar uma recente introdução ou ser o resultado da ocorrência de uma população reduzida, não identificada anteriormente pela não utilização de métodos de colheita apropriados.

Destaque ainda para as diferenças observadas na distribuição de mutações *kdr* em *A. gambiae*, sendo rara a presença da mutação L1014F na região litoral mas com uma frequência elevada na região interior, sugerindo uma subdivisão nas populações de *A. gambiae* como resultado da existência de barreiras ao fluxo genético (região florestal), da adaptação aos diferentes biótopos e a diferentes pressões seletivas. Para além de se ter verificado a presença de *A. arabiensis* na região costeira e em particular em Antula, verificou-se que esta população foi a única a apresentar a mutação L1014S juntamente com a mutação L1014F.

As espécies *A. gambiae* e *A. coluzzii*, consideradas altamente antropofílicas, apresentaram baixos níveis de antropofilia, sugerindo a presença de populações de mosquitos capazes de adaptarem o seu comportamento às condições ambientais existentes, nomeadamente a procura por hospedeiros alternativos, com consequências nos padrões de transmissão de malária.

PALAVRAS-CHAVE: Guiné-Bissau, *Anopheles gambiae*, híbridos, resistência a inseticidas.

ABSTRACT

Studies on relevant entomological parameters to malaria transmission by *Anopheles gambiae* s.l. in Guinea-Bissau

José Luis Cravo Vicente

Previous reports on the *Anopheles gambiae* complex species distribution in Guinea Bissau, pre-date the description of *A. gambiae* molecular forms or, in more recent surveys, the characterization is mainly focused in the coastal area. Consequently the possible differences associated with the transition between bio-ecological regions remains undetermined. In this region, high levels of hybridization between *A. gambiae* and *A. coluzzii* were previously described, suggesting the hypothesis that the country may contain the core of a secondary contact region between the two species. The *A. gambiae* complex species distribution and the geographic extension of hybridization occur are of upmost importance, since bioecological and behavioral differences between species (and hybrids) may affect malaria transmission. Moreover, the different spread of insecticide resistance mechanisms in the two species, such as the knock-down resistance (*kdr*), should be taken into consideration when planning insecticide-based control activities against these vectors.

Collections of *A. gambiae* s.l. females were carried out along a west to east transect in Guinea Bissau including 12 sites, crossing several biotopes. Molecular identification of the specimens was carried out using IGS and SINE markers. The *kdr* mutations (L1014F and L1014S) and *ace-1* (G119S) mutation were also investigated. The origin of blood-meal of fed females and *Plasmodium falciparum* sporozoite rates were determined by ELISA.

Overall, *A. gambiae* prevailed (50%) followed by *A. coluzzii* (23%). *Anopheles gambiae* was the most abundant species in the coastal and inland regions and *A. coluzzii* was the most frequent in the central region. A high proportion (21%) of hybrids between *A. coluzzii* and *A. gambiae* was also recorded, being highest in the coastal area, in agreement with previous studies.

Anopheles melas and *A. arabiensis* were also identified but their relative frequencies were low, 5% and 1%, respectively. The presence of a previously-undetected population of *A. arabiensis* in the coastal region is an unexpected finding and may represent a recent introduction or the result of a small population that could have remained undetected in previous surveys due not only to its low abundance, but also to inadequate sampling methodology.

The frequency of the L1014F mutation in *A. gambiae* was low in central and coastal regions, but high in the inland region, suggesting restrictions to gene flow between eastern and central/western populations in the country. *Anopheles coluzzii* specimens were characterized by the almost exclusive presence of the *kdr* susceptible allele. The western population of *A. arabiensis* in addition of carrying the L1014F mutation was the only species to present the L1014S mutation. The highly antropophilic species, *A. gambiae* and *A. coluzzii*, showed low levels of anthropophily, suggesting the presence of mosquito populations able to adapt their behavior to environmental conditions, namely in host seeking, with a potential impact on malaria transmission.

KEYWORDS: Guinea Bissau, *Anopheles gambiae*, hybrids, insecticide resistance.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE GERAL.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A Malária.....	2
1.1.1. O parasita.....	3
1.1.2. O vetor	5
1.2. Parâmetros entomológicos com importância em malária	9
1.3. O complexo <i>Anopheles gambiae</i>	10
1.3.1. Especiação em <i>A. gambiae s.s.</i>	11
1.3.2. Distribuição geográfica.....	13
1.3.3. Características bioecológicas e comportamentais.....	15
1.4. Controlo de vetores de malária.....	17
1.5. Resistência a inseticidas.....	19
1.5.1. Resistência local-alvo.....	21
1.6. Malária na Guiné-Bissau.....	23
1.6.1. Complexo <i>Anopheles gambiae</i> na Guiné-Bissau.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Caracterização da República da Guiné-Bissau	30
3.2. Colheitas entomológicas.....	31
3.3. Extração de ADN.....	33
3.4. Identificação das espécies do complexo <i>A. gambiae</i>	34
3.5. Identificação de <i>A. gambiae</i> e <i>A. coluzzii</i> por SINE-PCR.....	35
3.6. Detecção de mutações <i>kdr</i>	36
3.7. Detecção de mutações no gene <i>ace-1</i>	38
3.8. Detecção de fragmentos em gel de agarose.....	39
3.9. ELISA para a identificação de refeições sanguíneas em mosquitos.....	40
3.10. ELISA para a detecção de esporozoítos.....	42

3.11. Análise estatística e tratamento de resultados.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Identificação e distribuição das espécies do complexo <i>A. gambiae</i>	46
4.2. Pesquisa de mutações no gene <i>kdr</i> e <i>ace-1</i> em <i>A. gambiae s.l.</i>	48
4.3. Determinação da origem das refeições sanguíneas.....	50
4.4. Detecção da proteína CSP do parasita <i>P. falciparum</i>	53
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ÍNDICE DE FIGURAS.....	82
ÍNDICE DE TABELAS.....	83
ANEXOS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

5AS	– Ácido 5-aminosalicílico
AChe	– Enzima acetilcolinesterase
ace-1	– Gene que codifica a enzima acetilcolinesterase-1
ADN	– Ácido desoxirribonucleico (em inglês: <i>DNA – deoxyribonucleic acid</i>)
CDC	– <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CSP	– <i>Circumsporozoite protein</i> (Proteína circunsporozoítica)
DDT	– Dicloro-difenil-dicloroetano
dNTP's	– Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIR	– <i>Entomological Inoculation Rate</i> (Taxa entomológica de inoculação)
ELISA	– <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GST	– Glutathione-S-Transferases
H₂O	– Água
HCl	– Ácido clorídrico
IA	– Índice de antropofilia
IgG	– Imunoglobulina G
IGS	– <i>Intergenic spacer</i> (Espaçador intergénico)
IHMT	– Instituto de Higiene e Medicina Tropical
INASA	– Instituto Nacional de Saúde, Guiné-Bissau
IR	– <i>Indoor resting</i> (captura de mosquitos adultos em repouso feitas no interior de habitações humanas)
IRS	– <i>Indoor residual sparying</i> (Pulverização intradomiciliar com inseticidas)
ITNs	– <i>Insecticide-treated bed nets</i> (Redes mosquiteiras impregnadas)
ITS	– Internal Transcribed Spacers (Espaçador intergénico transcrito)
kdr	– Resistência <i>knockdown</i>
MoAbs*	– Anticorpo monoclonal conjugado com enzima peroxidase
NaCl	– Cloreto de Sódio
NaOH	– Hidróxido de Sódio
OC	– Inseticidas organoclorados
OMS	– Organização Mundial de Saúde
OP	– Inseticidas organofosfatos
OR	– <i>Outdoor resting</i> (captura de mosquitos adultos em repouso feitas no exterior de habitações humanas)
pb	– Pares de bases nucleotídicas
PBS	– Solução tampão fosfato salino 0,01M, pH7,4
PBS-T	– Tween [®] 20 (0,05%) em PBS
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
rADN	– ADN ribossomal
RFLP	– <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RIDL	– <i>Release of insects carrying a dominant lethal</i>

SDS	– <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SINE	– <i>Short Interspersed Element</i> (Elemento curto intercalado)
SIT	– <i>Sterile Insect Technique</i>
TBE	– Solução constituída por Trizma [®] base, Ácido bórico e EDTA
TE	– Solução constituída por Trizma [®] e EDTA
TEP-1	– <i>Thioester-containing protein-1</i>
UV	– Luz ultravioleta

1.INTRODUÇÃO

1.1. A malária

A malária humana é uma doença parasitária causada por cinco espécies de parasitas do género *Plasmodium*, nomeadamente *Plasmodium falciparum* (Welch 1896), *Plasmodium vivax* (Grassi and Feletti 1890), *Plasmodium ovale* (Stephens 1922), *Plasmodium malariae* (Laveran 1880) e *Plasmodium knowlesi* (Sinton and Mulligan 1932), (Antinori *et al.* 2012). A infeção por *P. falciparum* é a que causa maior mortalidade, sendo mais frequente no continente Africano, enquanto *P. vivax* apesar de apresentar uma maior dispersão mundial é menos virulenta. As restantes espécies são menos frequentes (Okwa, 2012).

Globalmente estima-se que 3,3 mil milhões de pessoas se encontrem em risco de serem infetadas por malária. Dos casos de malária diagnosticados, 80% ocorrem em populações da África subsaariana assim como 90% das mortes. As crianças de idade inferior a cinco anos e mulheres grávidas constituem os principais grupos de risco. (WHO, 2013)

A malária é uma doença essencialmente tropical e subtropical (Figura 1). É uma doença endémica em extensas regiões de África, da Ásia, da América Central e do Sul e ainda no Médio Oriente e Oceânia (Kager, 2002). A sua distribuição geográfica é reflexo de vários fatores tais como o clima, fatores populacionais, socioeconómicos, distribuição das espécies de mosquitos vetores e interações entre parasita, humanos e vetor (WHO, 2013).



Figura 1 – Distribuição da malária a nível mundial (WHO 2012, adaptado de www.anopheles-strasbourg.fr/whats-up/about-malaria/)

1.1.1. O parasita

O género *Plasmodium* inclui cerca de 200 espécies de parasitas que infetam répteis, aves e mamíferos (Yotoko & Elisei, 2006). Este género pertence ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Hematozoa, Ordem Haemosporida, Família Plasmodiidae e Género *Plasmodium* (Ayala *et al.*, 1998). Este género caracteriza-se por possuir no seu ciclo de vida uma fase sexuada exógena – Esporogonia, que ocorre em fêmeas de mosquitos anofelíneos (hospedeiro definitivo), e uma fase assexuada endógena – Esquizogonia, no hospedeiro vertebrado (hospedeiro intermediário) (Antinori *et al.*, 2012). Esta última inclui a esquizogonia exoeritrocitária ou hepática, que ocorre nas células parenquimatosas do fígado e a esquizogonia eritrocitária que ocorre no sangue (Knell, 1991). Este género de parasitas caracteriza-se ainda pela produção de um pigmento derivado da hemoglobina dos eritrócitos no hospedeiro vertebrado (hemozoína) e pela produção de esporozoítos infetantes no vetor (Chiodini *et al.*, 2001).

Ciclo de vida

Os parasitas causadores de malária humana apresentam um ciclo de vida complexo, dividido em duas fases distintas (Figura 2):

Fase sexuada ou esporogónica – Após um mosquito *Anopheles* fêmea efetuar uma refeição sanguínea, os gametócitos atingem o estômago e diferenciam-se em gâmetas masculinos (microgâmetas) e femininos (macrogâmetas). Os microgâmetas sofrem um processo de exflagelação e penetram os macrogâmetas, formando o zigoto, fase em que se dá o processo de meiose. Da maturação do zigoto resulta o oocineto, que é um corpo móvel e invasivo que irá perfurar e atravessar o epitélio estomacal do mosquito, alojando-se na parede externa do estômago, onde se diferencia num corpo circular e pigmentado – oocisto. Este sofre então uma série de mitoses originando formas móveis – os esporozoítos, que são libertados após a maturação do oocisto, migrando através do hemocélio do mosquito até às glândulas salivares. O mosquito *Anopheles* fêmea é agora um vetor de infeção.

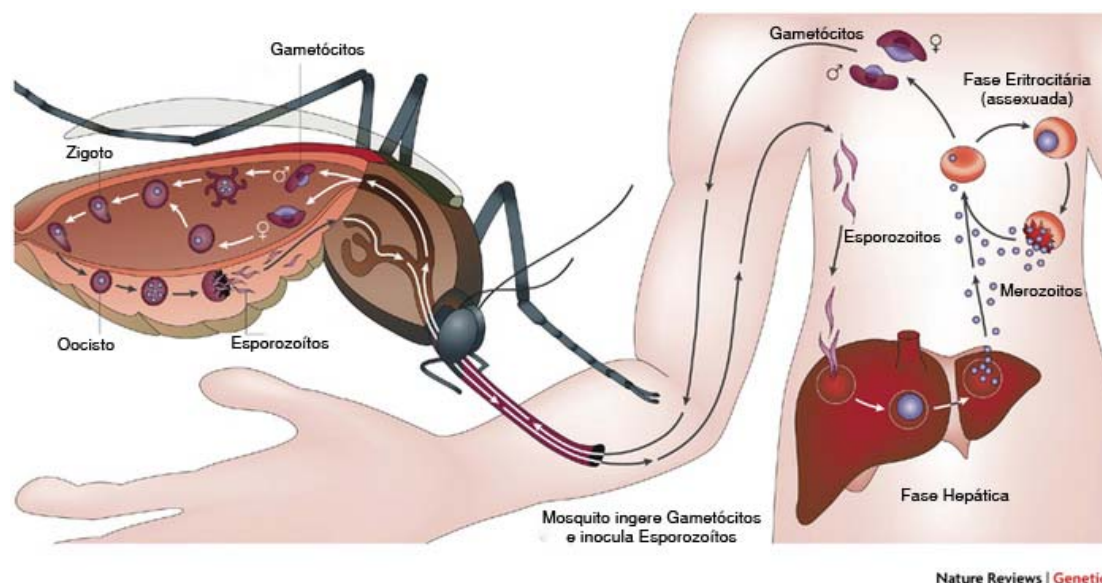


Figura 2 – Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. (Adaptado de Su *et al.*, 2007)

Fase assexuada ou esquizogônica – Numa picada posterior o mosquito inocula os esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, que atingem rapidamente o fígado invadindo os hepatócitos. Aqui vão diferenciar-se em trofozoítos hepáticos que por sua vez se vão desenvolver em esquizontes hepáticos ou pré-eritrocitários produzindo os merozoítos. Estes são libertados na circulação sanguínea, dando início à fase eritrocitária. Em *P. ovale* e *P. vivax* alguns trofozoítos hepáticos originam formas latentes denominadas hipnozoítos, podendo iniciar novos ciclos eritrocitários bastante tempo após a infecção inicial ter ocorrido (Antinori *et al.*, 2012). Quando entra na hemácia, o merozoíto desenvolve-se alimentando-se da hemoglobina da célula hospedeira e diferencia-se num trofozoíto eritrocítico. Após este período de crescimento o trofozoíto inicia um processo de divisão, podendo o seu núcleo dividir-se 3 a 5 vezes originando esquizontes eritrocitários, que irão produzir merozoítos. Uma vez libertados na circulação sanguínea, estes vão invadir outras hemácias, perpetuando o ciclo eritrocitário. Na corrente sanguínea, os ciclos de multiplicação dos esquizontes e merozoítos explicam a ocorrência de febres periódicas características da malária. Alguns dos merozoítos diferenciam-se em formas sexuais do parasita – gametócitos, que após nova refeição sanguínea por um mosquito, vão dar início a um novo ciclo esporogônico (Knell, 1991).

1.1.2. O vetor

Estão reconhecidas mais de 3500 espécies de mosquitos (Diptera: Culicidae) que se encontram agrupadas em 41 géneros. Apesar de vários géneros de mosquitos poderem transmitir espécies diferentes de *Plasmodium* aos vertebrados, a malária humana só é transmitida por fêmeas do género *Anopheles*. Este género engloba cerca de 462 espécies, das quais apenas cerca de 70 são vetores de malária humana (Service & Townson, 2002).

De acordo com a classificação de Richards & Davies (1977) atualizada por Harbach (2004), o género *Anopheles* pertence ao Reino Animalia, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Subclasse Pterigota, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Culicidae e Subfamília Anophelinae. O género *Anopheles* é ainda dividido em seis subgéneros, *Anopheles* (189 espécies), *Cellia* (239), *Kerteszia* (12), *Lophopodomyia* (6), *Nyssorhynchus* (33) e *Stethomyia* (5).

Ciclo de vida

Durante o seu ciclo de vida (Figura 3) as espécies do género *Anopheles*, tal como outros culicídeos, passam por etapas de desenvolvimento em meio aquático (ovo, larva e pupa) e terrestre (adulto ou imago).

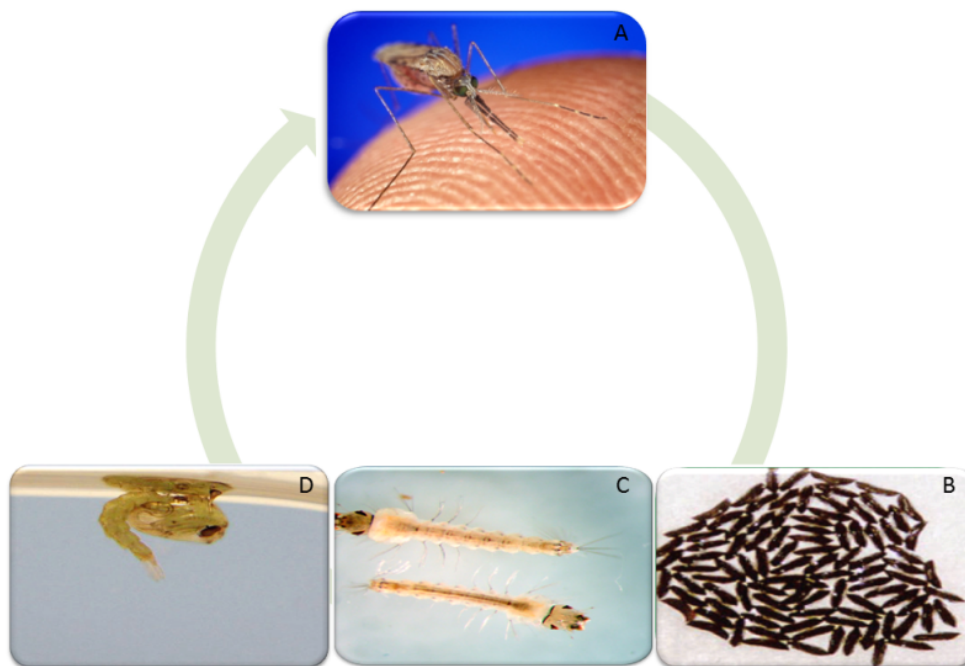


Figura 3 – Ciclo de vida dos mosquitos do género *Anopheles*. A) Adulto; B) Ovo; C) Larva; D) Pupa. (Adaptado de <http://www.map.ox.ac.uk/> e <http://entnemdept.ufl.edu/>)

O ciclo inicia-se quando a fêmea deposita os ovos em biótopos ou criadouros larvares aquáticos. Cada postura pode ter entre 50 a 200 ovos fertilizados que, por possuírem dois flutuadores laterais, se mantêm à superfície da água. Dois a três dias após a oviposição (dependendo das condições ambientais e da espécie) dá-se a eclosão larvar. As larvas apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen e não possuem um sifão respiratório. No entanto, apresentam espiráculos respiratórios presentes na face dorsal do 8º segmento do abdómen, que lhes permitem efetuar as trocas gasosas. Esta característica implica que as larvas de *Anopheles* se posicionem horizontalmente em relação à superfície da água, distinguindo-as de larvas de culicíneos que apresentam um sifão respiratório (Figura 4A).

As larvas são móveis e durante o seu desenvolvimento passam por três mudas ou ecdises correspondendo a quatro estados larvares (L1 a L4). O desenvolvimento larvar decorre durante 7 a 14 dias e as larvas alimentam-se de microrganismos e matéria orgânica dissolvida. No último estado de desenvolvimento (L4) as larvas sofrem uma metamorfose, originando as pupas.

As pupas apresentam uma forma de vírgula. A cabeça e o tórax formam um cefalotórax que possui um par de trompetas respiratórias. As pupas são capazes de se movimentar, mas não se alimentam, passando a maior parte do tempo à superfície a respirar. Nesta fase, ocorre uma metamorfose que dará origem ao mosquito adulto. O período pupal pode variar entre 2 a 3 dias nos trópicos até 12 dias em regiões temperadas. Uma vez emergido da pupa, o mosquito adulto irá repousar próximo do criadouro larvar até estar pronto para a cópula, o que geralmente acontece um ou dois dias após a emergência. Os machos alimentam-se apenas de néctares vegetais, sendo necessário às fêmeas realizarem uma refeição sanguínea para desenvolverem os ovos. O período de tempo compreendido entre a refeição sanguínea, a maturação dos ovos e a postura, é conhecido como ciclo gonotrófico (Braverman, 1994).

O corpo dos mosquitos adultos do género *Anopheles* apresenta-se dividido em cabeça, tórax e abdómen (Figura 4B). A cabeça possui um par de antenas (plumosas em machos e pilosas em fêmeas), dois olhos compostos, um par de palpos maxilares e um proboscis do tipo picador-sugador). Tanto as fêmeas como os machos deste género, ao contrário do que acontece nos géneros da subfamília *Culicinae*, possuem os palpos longos, aproximadamente do mesmo comprimento do proboscis. Nos machos, os palpos

são dilatados na extremidade (Figura 4A). O tórax é composto por três segmentos, apresentando cada um deles um par de patas, surgindo um par de asas do segundo segmento torácico e um par de balanceiros (asas modificadas) no 2º segmento. O abdômen é constituído por dez segmentos, dos quais apenas sete a oito são visíveis, sendo os últimos dois a três modificados para fins reprodutivos (Service, 1993). Os anofelíneos adultos são também distinguidos dos culicíneos através da sua posição em repouso, uma vez que nos primeiros o corpo adota uma posição oblíqua relativamente à superfície (Figura 4A).

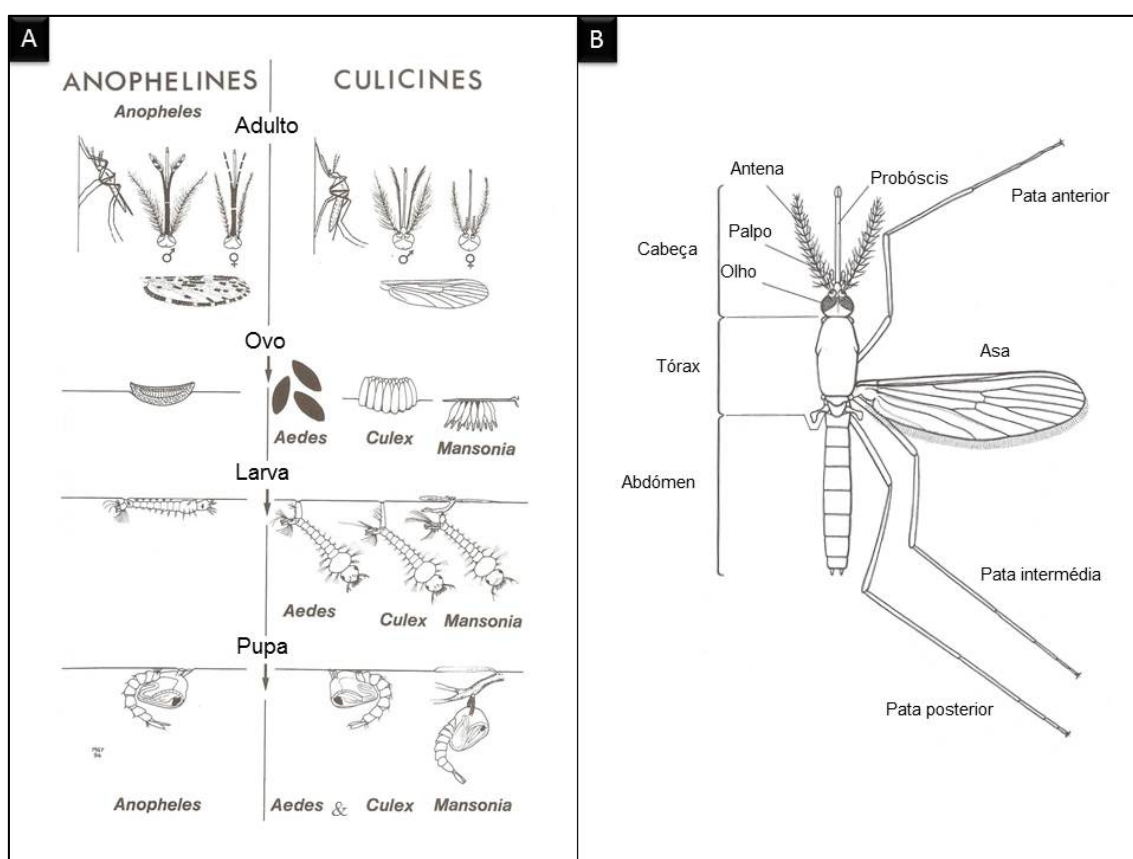


Figura 4 – (A) - Principais diferenças entre anofelíneos e culicíneos nas várias etapas do ciclo de vida - Dimorfismo sexual nas antenas e na extremidade dos palpos de fêmea e de macho de anofelíneo. Destaca-se ainda o comprimento destes: longos nos dois sexos. Diferença no posicionamento de larvas e adultos anofelíneos relativamente a culicíneos, bem como a presença de um sifão nas larvas de culicíneos, ausente nas larvas anofelíneas. **(B)** - Anatomia geral de um mosquito fêmea adulto (Adaptado de Service & Townson, 2002).

Aspetos bioecológicos e comportamentais

Os anofelíneos possuem uma distribuição geográfica ubíqua. Embora seja patente uma maior diversidade biológica nas regiões tropicais e subtropicais, também ocorrem diversas espécies nas regiões temperadas e existem mesmo registos de ocorrência no Ártico durante o Verão. A altitude é um fator limitante da sua distribuição geográfica, não se encontrando em altitudes superiores a 2000-2500 metros (Service & Townson, 2002).

Existe uma grande diversidade de tipos de coleção de água utilizados como criadouros ou habitats larvares. Alguns podem ser temporários (*e.g.* poças de água das chuvas) ou permanentes, como os campos de cultivo de arroz. Estes locais variam bastante entre espécies e são influenciados por fatores abióticos como a salinidade, pH, exposição solar, vegetação e disponibilidade de nutrientes, e por fatores bióticos como as interações entre espécies (predação e competição). Embora a maioria dos anofelíneos prefiram criadouros de água-doce, há espécies que toleram níveis de salinidade variáveis (*e.g.* *Anopheles melas* e *Anopheles merus*). A maioria das espécies requer um determinado tipo de criadouro bem definido. Porém, populações duma dada espécie podem, numa mesma área, explorar diferentes habitats larvares, ocorrendo nos mesmos também por vezes, espécies das outras subfamílias de Culicídeos (Rejmánková *et al.*, 2013).

Os anofelíneos adultos acasalam 1 a 2 dias após a emergência. As fêmeas acasalam, em regra, apenas uma vez na vida acumulando o esperma numa estrutura designada por espermateca, e são geralmente anautogéneas (*i.e.* necessitam de efetuar uma refeição sanguínea para completar o seu ciclo gonotrófico). As fêmeas da maioria das espécies de *Anopheles* alimentam-se em animais de sangue quente, principalmente em mamíferos, sendo denominadas de antropofílicas as que preferem alimentar-se em humanos, e zoofílicas as que procuram outros animais. No entanto estas características não são mutuamente exclusivas, podendo algumas espécies por vezes alimentarem-se em hospedeiros alternativos. Por outro lado, os anofelíneos podem também ser distinguidos como endofágicos, caso se alimentem preferencialmente no interior de instalações (*i.e.* habitação humana ou abrigo animal) ou exofágicos, caso procurem alimentar-se no exterior. Uma vez mais, uma série de situações intermédias podem ser encontradas nestes dois extremos. Após alimentarem-se, as fêmeas procuram um local

de repouso para a digestão e desenvolvimento gonotrófico, sendo denominadas de endofílicas as espécies que repousam no interior de instalações e exofílicas quando procuram locais de repouso no exterior. Em anofelíneos, a procura da refeição sanguínea ocorre principalmente no período noturno, mas o ciclo de picada é variável entre espécies, embora relativamente uniforme para a mesma espécie (Service & Townson, 2002).

1.2. Parâmetros entomológicos com importância em malária

Numa determinada região, a transmissão de malária depende de uma série de fatores relacionados entre si, dos quais se destacam a prevalência de infecção em humanos, a existência de condições ambientais propícias à reprodução dos mosquitos e ao seu desenvolvimento gonotrófico e as espécies de anofelíneos presentes, que consoante o seu grau de suscetibilidade à infecção, a frequência com que se alimenta em humanos, a sua densidade relativa e a longevidade média podem configurar-se como importantes vetores de malária (Snow & Gilles, 2002).

Assim, no decorrer de um estudo entomológico procede-se normalmente à obtenção de dados relativos à densidade relativa de mosquitos, sendo esta calculada relativamente à população humana. São ainda estimadas as prevalências de infecção nos mosquitos através da Taxa Esporozoítica (percentagem de mosquitos com esporozoítos nas glândulas salivares). Outro aspeto importante é a preferência hemática, determinada através da identificação da origem da refeição sanguínea no estômago de fêmeas recém-alimentadas. Tal permite a determinação do Índice de Antropofilia (IA) que representa a proporção de fêmeas recém-alimentadas cujo estômago contém sangue humano, índice necessário para a distinção entre espécies antropofílicas e zoofílicas (Garrett-Jones, 1964a). Numa abordagem para enquadrar as várias espécies quanto às suas preferências hemáticas, Garrett-Jones (1964a) agrupou as espécies com baixos valores de IA ($<0,1$) as espécies intermédias ($0,1 < IA < 0,5$) e as espécies com IA elevados ($>0,5$), refletindo, neste caso uma elevada antropofilia, encontrando-se neste grupo os principais vetores de malária em África, *A. gambiae* e *A. funestus*. No entanto estes intervalos podem variar sob a influência das várias circunstâncias naturais (*e.g.* disponibilidade de hospedeiros, pressões seletivas).

A intensidade da transmissão de malária é normalmente expressa através da taxa entomológica de inoculação (EIR), sendo definida como o número de picadas infetantes que um indivíduo sofre por unidade de tempo. Para o cálculo desta taxa, é necessário estimar a densidade dos vetores em relação aos humanos e a taxa esporozoítica.

Finalmente, a capacidade vetorial (C) é o parâmetro que permite caraterizar a eficiência da transmissão de malária numa região. Este parâmetro, obtido a partir da estimativa de várias caraterísticas da população (*e.g.* densidade, hábito de picada, sobrevivência, duração do ciclo esporogónico) expressa a capacidade de uma população de uma espécie vetora para transmitir a malária, em termos do potencial número de inoculações secundárias originadas por unidade de tempo a partir de uma pessoa infetante (Garrett-Jones, 1964b).

1.3. O complexo *Anopheles gambiae*

Muitas espécies de mosquitos vetores de malária pertencem a complexos de espécies gémeas, *i.e.* grupos de espécies não distinguíveis morfologicamente mas que diferem geneticamente e são reprodutivamente isoladas. As espécies pertencentes a um complexo podem apresentar diferenças ecológicas e comportamentais (*e.g.* hábitos alimentares), o que lhes confere diferentes importâncias médicas. O complexo *Anopheles gambiae* é talvez o mais estudado atualmente pois inclui os principais vetores Afro-tropicais de malária. Este complexo é composto por oito espécies (Coetzee *et al.*, 2013): *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson, sp. n., *Anopheles gambiae sensu stricto* (*s.s.*) Gilles, 1902 (daqui em diante designado por *A. gambiae*); *Anopheles merus* Dönitz, 1902; *Anopheles melas* Theobald, 1903; *Anopheles arabiensis* Patton, 1905; *Anopheles bwambae* White, 1985; *Anopheles quadriannulatus* Theobald, 1911 e *Anopheles amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee, 2013. Das espécies anteriores, realce para *A. coluzzii*, *A. gambiae* e *A. arabiensis* que, do ponto de vista epidemiológico, são as mais importantes (Service & Townson, 2002; White, 2003; Lanzaro & Lee 2013), sendo as mais associadas ao Homem e com maior distribuição geográfica na região Afro-tropical, ocorrendo em simpatria em extensas áreas da sua distribuição. A espécie *A. comorensis*, capturada numa única ocasião no arquipélago das ilhas Comores no oceano Índico, foi descrita com base em caracteres morfológicos e pouco se sabe sobre a

sua biologia, sendo a sua associação ao complexo *A. gambiae* ainda controversa (Brunhes *et al.*, 1997; Coetzee *et al.*, 2013).

A impossibilidade de distinção morfológica entre as espécies do complexo levou ao desenvolvimento de metodologias de identificação alternativas, como estudos de acasalamento cruzado, testes de tolerância à salinidade, eletroforese isoenzimática, análise citogenética e análises de ADN (Coetzee *et al.*, 2000).

As análises citogenéticas foram inicialmente as mais utilizadas, permitindo a identificação dos membros do complexo *A. gambiae* com base na presença de inversões paracêntricas fixas, presentes no cromossoma X e específicas de espécie (Coluzzi *et al.*, 1979). Uma limitação desta técnica é estar limitada à identificação de larvas L4 e de fêmeas semi-grávidas, onde é possível isolar cromossomas politénicos, utilizados na visualização dos padrões de bandamento cromossômico a partir dos quais se identificam as inversões.

O desenvolvimento de técnicas baseadas na análise de ADN, em particular na reação em cadeia da polimerase (PCR), permitiu contornar as dificuldades apresentadas pelos métodos anteriores (Hill & Crampton, 1994). Atualmente, a identificação dos membros do complexo é realizada essencialmente por ensaios de PCR que identificam polimorfismos de tamanho, específicos de espécie, presentes na região do espaçador intergénico (IGS) do ADN ribossomal (rADN) no cromossoma X (Scott *et al.*, 1993; Townson & Onapa, 1994; Fettene *et al.*, 2002).

1.3.1. Especiação em *A. gambiae* s.s.

A espécie nominal do complexo, *A. gambiae* s.s., terá passado por um processo de especiação recente. As primeiras evidências surgiram através de estudos sobre inversões paracêntricas (Coluzzi *et al.*, 1979, 1985; Coluzzi, 1982). Ao longo da sua distribuição geográfica, parecem existir barreiras ao fluxo genético entre subpopulações com diferentes rearranjos de inversões paracêntricas polimórficas no cromossoma 2 (Coluzzi *et al.*, 1985). Assim, e tendo ainda em conta diferenças comportamentais e bioecológicas, foram definidas em *A. gambiae* s.s. cinco formas cromossômicas ou citoformas, denominadas de Mopti, Bamako, Savanna, Bissau e Forest (Coluzzi *et al.*, 1985; Krzywinski & Besansky, 2003).

Ao serem analisadas sequências de várias regiões genómicas, pequenas diferenças genéticas foram encontradas entre as citoformas (Gentile *et al.*, 2001; Mukabayire *et al.*, 2001). Nomeadamente, foram encontrados polimorfismos nas regiões não codificantes (IGS) e espaçadores internos transcritos 1 e 2 (ITS-1 e ITS-2) do rADN, que permitiam discriminar consistentemente as citoformas Mopti das citoformas Bamako e Savanna, em populações do Burkina Faso e Mali (Favia *et al.*, 1997, 2001; Gentile *et al.*, 2001). Duas formas moleculares foram então definidas com base nestes polimorfismos (em particular o polimorfismo na região IGS), a forma molecular M (Mopti) e a forma molecular S (Savanna/Bamako) (Favia *et al.*, 2001; della Torre *et al.*, 2001). Posteriormente, outros marcadores, como o retrotransposão SINE200X6.1 (seguidamente designado por SINE), foram também referenciados na diferenciação das formas moleculares (Santolamazza *et al.*, 2008a), tendo-se verificado que esta inserção se encontra fixa em todos os indivíduos pertencentes à forma molecular M e ausente da forma molecular S.

Estudos posteriores alargados a outras regiões do continente Africano demonstraram que a forma molecular S corresponde às citoformas Bamako, Savanna e Forest, enquanto a forma molecular M corresponde às citoformas Mopti, Bissau, Savanna e Forest (della Torre *et al.*, 2001). Mas o que estes estudos também revelaram foi uma muito reduzida (em regra <1%) taxa de hibridação entre as formas M e S, apesar de partilharem extensas áreas de simpatria em praticamente toda a África Ocidental (della Torre *et al.*, 2002). Estes resultados foram tidos como evidência para a presença de duas unidades genéticas reprodutivamente isoladas entre si. No entanto, uma exceção parece ser o extremo ocidental de África, onde foram reportadas elevadas frequências de hibridação, nomeadamente na Guiné-Bissau e na Gâmbia (Oliveira *et al.*, 2008; Caputo *et al.*, 2008).

A possibilidade de isolamento reprodutivo entre as duas formas moleculares foi corroborada por duas evidências adicionais. A primeira consiste na distribuição de mutações associadas à resistência aos inseticidas. Em *A. gambiae* estão descritas duas mutações (L1014F e L1014S) no gene que codifica os canais de sódio do sistema nervoso, implicadas na resistência do tipo *knockdown* (*kdr*) a inseticidas piretróides e organoclorados (DDT) (Martinez-Torres *et al.*, 1998; Ranson *et al.*, 2000). Estudos na África Ocidental envolvendo populações simpátricas revelaram elevadas frequências da

mutação L1014F na forma S mas uma ausência ou muito baixa frequência na forma M (Santolamazza *et al.*, 2008b). Esta mutação presumivelmente teve origem e dispersou-se na forma S, tendo mais tarde sido adquirida pela forma M por introgressão genética, encontrando-se agora em dispersão nesta espécie (Weill *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2007; Etang *et al.*, 2009; Weetman *et al.*, 2012; Clarkson *et al.*, 2014).

A segunda evidência foi obtida através da análise de um gene relacionado com a resposta imune do mosquito, nomeadamente o TEP-1 (*thioester-containing protein-1*). Este gene codifica uma proteína com atividade antiparasítica e antibacteriana no mosquito (Blandin *et al.*, 2004). Verificou-se que uma variante alélica que confere resistência à infeção por parasitas de malária se encontrava fixa na forma M mas ausente na forma S, em populações simpátricas na África Ocidental (White *et al.*, 2011a).

O crescente número de evidências genéticas, associado a estudos bioecológicos que sugerem diferenças fenotípicas entre as formas moleculares, nomeadamente ao nível da ecologia larvar (Diabaté *et al.*, 2008; Gimonneau *et al.*, 2012) e do comportamento de acasalamento (Diabaté *et al.*, 2003; Dabiré *et al.*, 2013), culminaram na recente elevação das formas moleculares ao estatuto de espécie (Coetzee *et al.*, 2013). Assim, a forma molecular M foi nomeada *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson sp. n., enquanto que a forma S manteve designação original de *A. gambiae* Giles. No mesmo artigo, é também descrita e nomeada a espécie *Anopheles amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee sp. n., originalmente descrita como *A. quadriannulatus* sp. B (Hunt *et al.*, 1998).

1.3.2. Distribuição geográfica

Os membros do complexo *A. gambiae* encontram-se dispersos por toda a África subsariana e ilhas adjacentes (Figura 5). Já foram também reportados exemplares na Arábia Saudita e no Yémen (Coetzee *et al.*, 2000).

As espécies *A. merus* e *A. melas* estão associadas a habitats larvares de águas salobras, apresentando uma distribuição restrita às zonas costeiras oriental e ocidental, de África, respetivamente. *Anopheles bwambae* apresenta uma distribuição geográfica limitada ao Parque Florestal Nacional de Semliki na zona ocidental do Uganda. As espécies *A. quadriannulatus* e *A. amharicus* são principalmente zoofílicas e não são

consideradas vetores de malária. Possuem uma distribuição dispersa em regiões do sudeste africano (Coetzee *et al.*, 2000), tendo *A. amharicus* sido reportado na região de Jimma, Etiópia (Hunt *et al.*, 1998). Relativamente a *A. coluzzii*, *A. gambiae* e *A. arabiensis*, são as espécies que apresentam a distribuição mais abrangente e são consideradas os principais vetores de malária humana, coexistindo em simpatria em vastas regiões da África subsaariana (Sinka *et al.*, 2012). A distribuição de *A. coluzzii*, contudo, parece estar restrita à África Ocidental (della Torre *et al.*, 2005; Coetzee *et al.*, 2013).

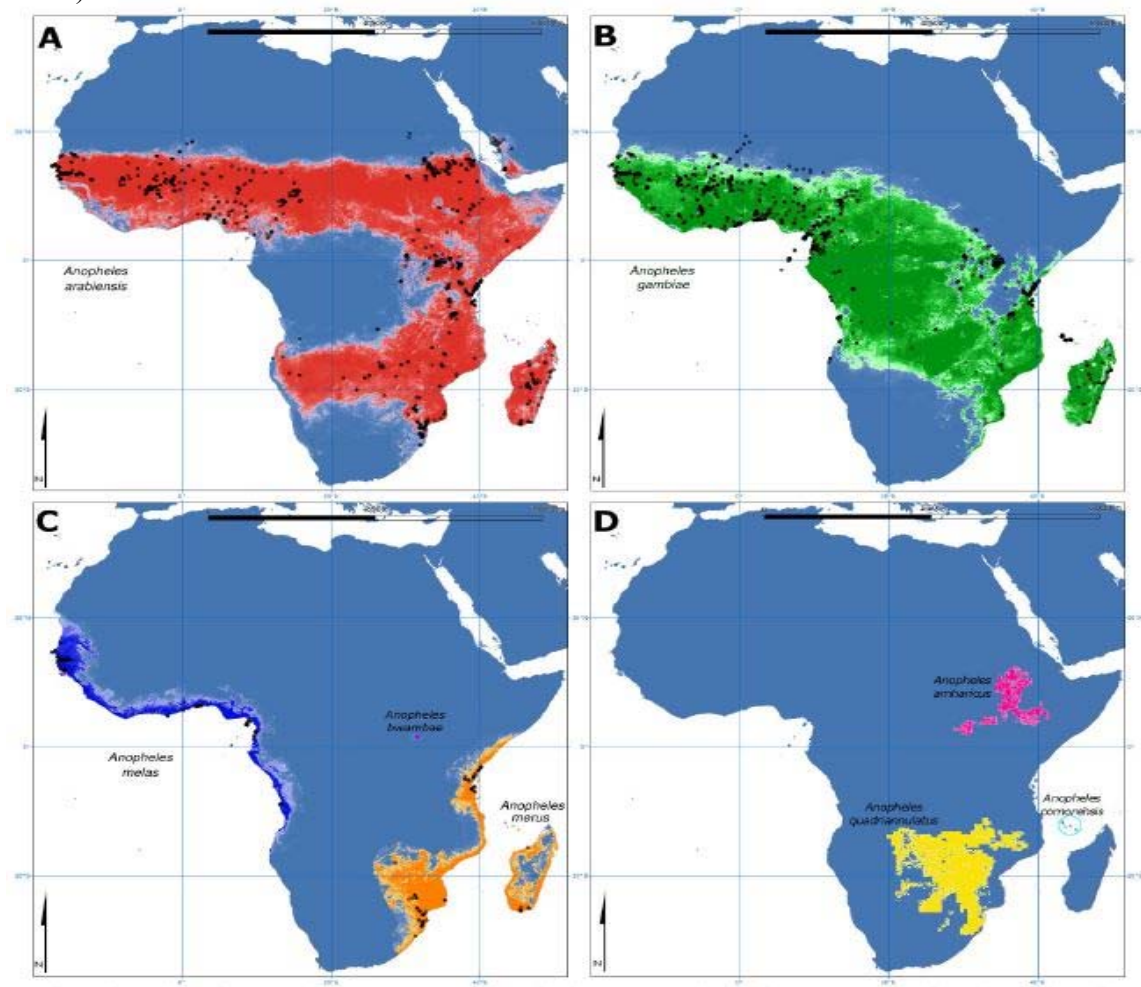


Figura 5. Distribuição geográfica dos membros do complexo *A. gambiae*. (Lanzaro & Lee, 2013) **A)** *A. arabiensis*; **B)** *A. gambiae* s.s. (i.e. sem a separação de *A. coluzzii*); **C)** *A. melas*; *A. merus* e *A. bwambae*; **D)** *A. quadriannulatus*, *A. amharicus* (anteriormente *A. quadriannulatus* B) e *A. comorensis*.

1.3.3. Caraterísticas bioecológicas e comportamentais

As espécies pertencentes ao complexo *A. gambiae* apresentam diferenças bioecológicas e comportamentais. A seguinte caraterização das espécies constituintes do complexo é baseada na revisão de Sinka *et al.* (2010), exceto quando especificamente referenciado.

Apesar da sua ampla distribuição geográfica e consequente variabilidade de condições ecológicas, uma combinação de padrões permite aos mosquitos da espécie *A. gambiae* serem considerados dos principais e mais importantes vetores de malária na africa subsaariana, sendo por isso, os mais bem estudados. É um mosquito adaptado ao ambiente peridoméstico em conformidade com os fortes padrões endofílicos e preferências antropofílicas (Service, 1993). No entanto, fêmeas com comportamento zoofílico e exofílico foram já reportadas (Diatta *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 2001), demonstrando a possibilidade de existência de populações com comportamentos extremamente diversos, associados a fatores como a disponibilidade de hospedeiros e, possivelmente ao perfil genético da população.

As larvas de *A. gambiae* possuem um período relativamente curto de desenvolvimento e podem ser encontradas numa grande variedade de coleções de água doce (muitas derivadas da atividade humana). Os mais comuns para esta espécie são criadouros temporários, como marcas deixadas por pneus ou pegadas preenchidas por água da chuva. Assim, as alterações de abundância desta espécie estão associadas aos padrões sazonais das épocas das chuvas, atingindo um pico de densidade em regra a meio dos períodos das chuvas. A espécie *A. coluzzii* encontra-se distribuída pelas regiões ocidental e central do continente africano encontrando-se ausente nas regiões orientais, com a exceção de dois exemplares colhidos em Kanyemba, uma localidade no norte do Zimbabwe (della Torre *et al.*, 2005).

No entanto, é frequente a ocorrência em simpatria com *A. gambiae*. Por vezes, verificam-se frequências relativas opostas entre as duas espécies, mesmo quando colhidas em localidades vizinhas. Este fenómeno tem sido por vezes associado à presença de criadouros temporários *versus* criadouros mais permanentes, estando *A. coluzzii* mais associado a criadouros permanentes associados à atividade humana, como arrozais, escavações e lagos artificiais (della Torre *et al.*, 2005), devido a uma maior

capacidade de evitar predadores (Diabaté *et al.*, 2008), o que lhes confere uma vantagem competitiva neste tipo de criadouros mais permanentes.

Anopheles arabiensis é o membro do complexo com maior plasticidade bioecológica e comportamental. Ocorre em simpatria com *A. gambiae* em extensas áreas, mas ocupa habitats mais áridos, como savanas ou florestas pouco densas, onde a estação das chuvas é mais curta ou onde a precipitação é escassa. *Anopheles arabiensis* é geralmente definido como mais exofágico e exofílico do que *A. gambiae*, podendo, consoante a localização geográfica, variar os seus padrões de picada e de repouso. Evidencia ainda, um maior oportunismo em termos de preferências hemáticas. Ainda que marcadamente antropofílico, também se alimenta de gado e, em meio doméstico, o seu índice de antropofilia pode ser modificado em função da disponibilidade de hospedeiros humanos e não-humanos, em particular gado.

As formas imaturas de *A. melas* desenvolvem-se em habitats de água salobra como estuários, lagunas e mangais. No estado adulto, sua menor antropofilia bem como uma longevidade mais reduzida fazem desta espécie um vetor de malária secundário. As preferências hemáticas são variáveis, sendo muito antropofílicos na presença de humanos, mas na sua ausência são marcadamente zoofílicos. É uma espécie geralmente considerada exofílica, porém, alimentam-se quer no interior quer no exterior de habitações. Na estação das chuvas, a abundância deste mosquito é função tanto da pluviosidade como das marés enquanto na estação seca, é unicamente função das marés.

Anopheles merus tem sido considerado como um vetor secundário, incapaz por si só de sustentar a transmissão de malária. Porém, parece apresentar um papel importante na transmissão de malária em regiões costeiras da Tanzânia e Moçambique. É também uma espécie associada a águas salobras, no entanto, não suporta níveis de salinidade tão elevados como *A. melas*. É característico de pântanos ou poças de água rasas e salobras, típicos das regiões litorais, mas pode ser encontrado em regiões mais interiores. Apresenta um comportamento geralmente exofílico e exofágico, sendo oportunista na escolha do hospedeiro.

Os restantes membros do complexo *A. gambiae* apresentam distribuições geográficas muito restritas, como *A. bwambae*, que apenas está descrito numa área geotermal na região ocidental do Uganda, onde é um importante vetor de malária humana, sendo bastante antropofílico (White, 1985), ou um comportamento

marcadamente zoofílico não sendo considerados vetores de malária humana, como o é o caso de *A. quadriannulatus* e *A. amharicus*.

1.4. Controlo de vetores de malária

O controlo da malária assenta em três pilares essenciais (WHO, 2013): i) controlo do parasita, baseado em fármacos antimaláricos, para terapêutica e profilaxia, e na deteção e manejo atempado de casos; ii) educação comunitária, essencial para promover alterações nos hábitos das populações humanas que influenciam a eficácia dos métodos de controlo; iii) controlo do vetor.

O controlo vetorial é considerado como a melhor estratégia de proteção de uma comunidade contra a infeção por malária, tendo como principal objetivo a diminuição do contato humano-vetor. Para tal, podem ser utilizadas abordagens que visam as diferentes fases do ciclo de vida de um mosquito. Assim, para as fases imaturas do mosquito vetor, podem ser aplicados métodos de controlo larvar que se subdividem em controlo físico (*e.g.* remoção de criadouros larvares), químico (*i.e.* baseados em inseticidas ou reguladores de crescimento) e biológico (*e.g.* *Gambusia* sp., *Bacillus thurigiensis israelensis*).

Na fase adulta, estão em fase de desenvolvimento novos métodos de controlo, tais como o controlo genético, através da introdução de insetos machos estéreis (SIT – *sterile insect technique*) (Nolan *et al.*, 2011; Hassan *et al.*, 2014), ou na produção de mosquitos fêmea transgénicos apresentando um gene letal (RIDL: *release of insects carrying a dominant lethal*), que quando expresso permite apenas a sobrevivência dos machos (Thomas *et al.*, 2000); ou o controlo biológico, através de fungos entomopatogénicos (Scholte *et al.*, 2005; Howard, 2011).

No entanto, o controlo químico, *i.e.* baseado em inseticidas, continua a ser a estratégia mais utilizada nos programas de controlo de vetores. Assim, para o controlo da malária, a OMS recomenda dois métodos principais de controlo de mosquitos na fase adulta: i) pulverizações intradomiciliares com inseticidas residuais, que visam principalmente uma redução das populações do vetor; ii) impregnação de redes mosquiteiras para proteção individual (Beales & Gilles, 2002; WHO, 2013).

Vários têm sido os inseticidas utilizados para o controlo de malária. No entanto, os inseticidas pertencentes a 4 classes químicas principais merecem destaque dada a sua extensiva utilização e papel histórico no controlo da malária.

Organoclorados (OC) – Estes inseticidas possuem um efeito neurotóxico exercendo a sua ação por contato. Atuam ao nível dos canais de sódio do sistema nervoso dos insetos impedindo que estes alternem entre a conformação aberta e fechada, perpetuando a propagação dos impulsos nervosos, resultando na paralisia e morte do inseto pela hiperexcitação do sistema nervoso. Deste grupo faz parte o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) que terá sido até hoje o inseticida mais utilizado no controlo vetorial. Este composto foi amplamente utilizado nos programas de erradicação da malária nos anos 50 e 60 do século XX (Nájera *et al.*, 2011), e que resultaram na erradicação desta doença nas regiões temperadas (de Zulueta J., 1997). Este inseticida é normalmente utilizado em pulverizações intradomiciliares embora tenha sido também inicialmente utilizado como larvicida (Pates & Curtis, 2005). São compostos com uma ação residual prolongada, podendo permanecer ativos durante um ano. Apresentam ainda várias características que os tornaram extensivamente usados, como a sua fácil produção, baixo custo e elevada toxicidade para os insetos. No entanto, o seu uso foi reduzido devido à sua toxicidade no meio ambiente e ao aparecimento de resistência por parte dos mosquitos, culminando com a não recomendação do seu uso pela OMS, nos finais da década de 70 (Turusov *et al.*, 2002). Atualmente assiste-se ao regresso da utilização deste inseticida para o controlo vetorial de acordo com as recomendações e diretrizes da OMS, sendo recomendado em situações específicas onde seja seguro, eficaz, acessível economicamente e quando não estão disponíveis alternativas (WHO, 2006). Ainda no grupo dos inseticidas organoclorados encontram-se os ciclodienos destacando-se a dieldrina, que foi utilizado nos programas de controlo da malária, como alternativa ao DDT até finais da década de 60, tendo sido progressivamente descontinuado devido à sua toxicidade para o Homem e ao surgimento de resistência nas populações de mosquitos (Walker, 2000).

Organofosfatos (OP) – Com as restrições impostas ao uso dos organoclorados, os menos persistentes mas altamente eficazes OP vieram substituir na maioria dos casos o uso do DDT em pulverizações intradomiciliares (Pope, 2010). Inicialmente estes inseticidas apresentavam elevada toxicidade tanto para insetos como para mamíferos, o

que levou ao desenvolvimento de moléculas com ação mais seletiva. O malatião foi o primeiro exemplo de um inseticida OP de largo espectro com os requisitos procurados. Os organofosfatos atuam inibindo a acetilcolinesterase (AChE), enzima do sistema nervoso, que degrada o neurotransmissor acetilcolina na sinapse nervosa.

Piretróides – Estes compostos constituem uma classe de inseticidas sintéticos, derivados de um grupo de inseticidas de origem natural, as piretrinas, extraídas de crisântemos (*Chrysanthemum spp.*) (Beales & Gilles, 2002). Entre os piretróides, destacam-se a deltametrina, permetrina, cipermetrina e lambda-cialotrina como os mais utilizados no controlo de vetores de malária (Elliot, 1989). Estes inseticidas são os únicos compostos recomendados pela OMS para o tratamento de redes mosquiteiras (WHO, 2012b). Apresentam elevada toxicidade e ação rápida contra insetos, baixa toxicidade para mamíferos e degradam-se em subprodutos que não se acumulam nos ecossistemas. (Hemingway *et al.*, 2004). Os piretróides apresentam um modo de ação idêntico ao DDT, inibindo os canais de sódio do sistema nervoso dos insetos.

Carbamatos – Estes inseticidas possuem um modo de ação semelhante aos OP's, sendo utilizados em programas de controlo vetorial, substituindo total ou parcialmente os piretróides em pulverizações intradomiciliares (van der Berg *et al.*, 2012), sendo ainda sugerida a sua utilização como complemento à utilização de redes mosquiteiras tratadas (Djènoutin *et al.*, 2010). No entanto, a sua utilização representa apenas uma pequena percentagem relativamente à utilização global de inseticidas no controlo de vetores (WHO, 2012b). À semelhança dos OP's estes compostos induzem uma resposta excitorepelente residual no vetor. Possuem, contudo, uma atividade residual curta (2-6 meses), sendo mais dispendiosos do que os piretróides e o DDT (WHO, 2012b).

1.5. Resistência a inseticidas

A resistência a inseticidas é um dos mais rápidos e documentados processos de adaptação evolutiva relacionada com alterações ambientais e é definida como a ocorrência de insetos com características hereditárias que lhes conferem a capacidade de resistir aos efeitos tóxicos de inseticidas que exercem um efeito letal na maioria dos indivíduos que compõem uma população natural da mesma espécie (Ranson *et al.*, 2011).

A resistência aos inseticidas é um fenómeno multifatorial, que resulta de mecanismos intrínsecos aos insetos, em regra com uma base genética, e da sua interação com o meio ambiente. Os vários mecanismos que, individualmente ou combinados, permitem aos insetos resistir à ação dos inseticidas podem ser agrupados em quatro categorias (Corbel & N'Guessan, 2013): resistência comportamental, resistência cuticular, resistência metabólica e resistência local alvo.

A exposição prolongada a inseticidas como o DDT e a permetrina podem promover alterações comportamentais nas populações de mosquitos, tais como a redução do número de mosquitos que entram nas habitações para se alimentarem e/ou o aumento do número de fêmeas recém-alimentadas que sai mais cedo das habitações, ou seja, um desvio comportamental para uma tendência mais exofágica e exofílica (Hemingway *et al.*, 2004). Alterações no ciclo de picada noturna, por exemplo para a ocorrência do pico de picada nas primeiras horas da noite, e um aumento da zoofília, podem também ocorrer como resposta à pressão seletiva dos inseticidas (Molineaux & Gramiccia, 1980; Duchemin *et al.*, 2001). Algumas populações de mosquitos resistentes aos inseticidas desenvolvem cutículas mais espessas ou com uma estrutura lipídica alterada, reduzindo a permeabilidade aos inseticidas (Awolola *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2010; Ranson *et al.*, 2011). Este tipo de resistência encontra-se por vezes em conjunto com outros mecanismos, intensificando os efeitos destes (Wood *et al.*, 2010).

A resistência metabólica é mediada por uma alteração nos sistemas enzimáticos responsáveis pela destoxificação ou sequestro de toxinas no inseto (WHO, 2012b). Estas enzimas pertencem essencialmente a três famílias, carboxilesterases, citocromo P450 monooxigenases e Glutathione-S-Transferases (GST). Um aumento na expressão de genes que codificam enzimas destoxificantes é uma das causas mais comuns de resistência a inseticidas em mosquitos. A sobre-expressão destas enzimas pode ocorrer em resultado do aumento do número de cópias do gene (*e.g.* duplicação), devido a alterações nos elementos reguladores da transcrição ou devido a alterações na região promotora deste gene (Hawkes & Hemingway, 2002; Edi *et al.*, 2014). As consequências são um aumento na produção enzimática que permite aos insetos metabolizar ou degradar os inseticidas antes que estes exerçam o efeito tóxico (Hemingway & Ranson, 2000; Corbel & N'Guessan, 2013).

1.5.1. Resistência local alvo

A par da resistência metabólica, este é o mecanismo mais comum de resistência em insetos. Os locais de ação dos inseticidas estão em regra situados no sistema nervoso dos insetos. Estes locais podem ser alterados por intermédio de mutações genéticas, inviabilizando a ligação da toxina, reduzindo assim os seus efeitos inibitórios. De entre os mecanismos de resistência local alvo, destacam-se em vetores de malária as mutações no gene acetilcolinesterase (*ace-1*) e nos canais de sódio (resistência *knockdown-kdr*).

Acetilcolinesterase (AChE-1) – A maioria dos insetos possui duas enzimas acetilcolinesterase, codificadas pelos genes *ace-1* e *ace-2*. O gene *ace-1* é expresso no sistema nervoso central, e a enzima é responsável pela hidrólise da acetilcolina nas sinapses. Esta enzima é o local alvo dos organofosfatos e carbamatos e a sua inibição por estes inseticidas causa a morte do inseto por paralisia. Foram já descritas várias mutações em insetos no gene *ace-1* (Weill *et al.*, 2003; Fournier, 2005). Em vetores de malária, a mutação G119S (substituição do aminoácido glicina por uma serina, na posição 119) foi já reportada em *A. gambiae* e *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820. Estas mutações mantêm-se essencialmente em heterozigotia com o alelo selvagem, devido aos elevados custos de *fitness* que esta mutação acarreta em genótipos homozigóticos (Weill *et al.*, 2004), nomeadamente a diminuição de atividade enzimática e menor sucesso reprodutivo (Essandoh *et al.*, 2013). Estudos sugerem que a duplicação do gene mutado pode funcionar como um mecanismo compensatório da perda de *fitness* (Djogbénou *et al.*, 2008).

O gene *ace-2*, não é essencial para as transmissões sinápticas e as mutações aí encontradas não estão relacionadas com a resistência (Fournier, 2005). Estudos sugerem que possa estar envolvido em processos de neurogénese e sinaptogénese, cujos mecanismos serão também dependentes da hidrólise da acetilcolina (Huchard *et al.*, 2006; Kim & Lee, 2013).

Resistência *knockdown* – Os inseticidas piretróides e o DDT atuam ao nível dos canais de sódio para-tipo (*voltage-gated*) do sistema nervoso dos insetos. Estes canais são constituídos por quatro domínios (I-IV), cada um constituído por seis hélices transmembranares (S1-S6) (Figura 6). Os inseticidas impedem que os canais de sódio alternem entre a conformação aberta e fechada, perpetuando a propagação dos impulsos

nervosos, resultando na paralisia e morte do inseto. A este fenómeno atribui-se o termo genérico de efeito *knockdown*.

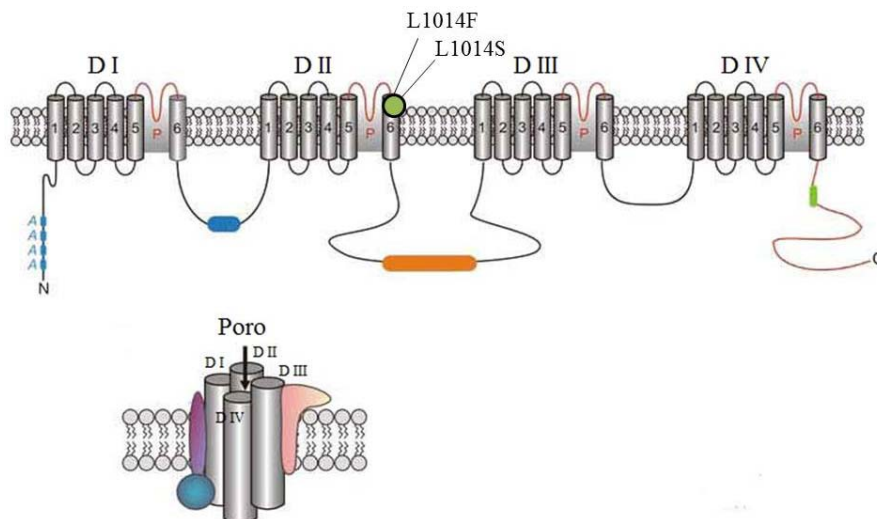


Figura 6 – Esquema da estrutura transmembranar do canal de sódio para-tipo (*voltage gated*), onde se mostram os quatro domínios homólogos (DI – IV), cada um possuindo seis hélices transmembranares (S1-6). Na hélice seis do DII estão assinalas as mutações L1014F e L1014S associadas com resistências *kdr*. (Adaptado de Soderlund & Knipple, 2003).

Nos membros do complexo *A. gambiae*, em particular *A. coluzzii*, *A. gambiae* e *A. arabiensis* foram identificadas duas mutações *kdr*. A substituição de um resíduo de leucina por fenilalanina na posição 1014 do gene (L1014F, Martinez-Torres *et al.*, 1988) e a substituição no mesmo resíduo e na mesma posição mas por serina (L1014S, Ranson *et al.*, 2000)

A mutação L1014F foi descrita em várias populações de *A. gambiae* da África Ocidental e Central, atingindo elevadas frequências, enquanto o alelo 1014S, originalmente descrito na África Oriental, ocorre simultaneamente com o alelo 1014F na África Central (Etang *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006; Santolamazza *et al.*, 2008b). Relativamente a *A. coluzzii*, as mutações *kdr* são menos frequentes, mesmo em áreas onde as mutações ocorrem com elevadas frequências nas populações simpátricas de *A. gambiae* (Santolamazza *et al.*, 2008b). De fato, em estudos anteriores, a ausência do alelo 1014F em populações simpátricas de *A. coluzzii* foi considerado uma forte evidência de restrição ao fluxo genético entre esta espécie e *A. gambiae* (della Torre *et al.*, 2001). Estudos iniciais demonstraram que a presença do alelo 1014F em *A. coluzzii* poderá ter ocorrido através de eventos esporádicos de introgressão genética com *A.*

gambiae (Weill *et al.*, 2000). No entanto existem exceções, onde origens independentes desta mutação em *A. coluzzii* foram já observadas (Reimer *et al.*, 2005; Etang *et al.*, 2009).

Mais recentemente, têm sido publicados estudos onde se verifica um aumento considerável das frequências *kdr* em *A. coluzzii* (Moreno *et al.*, 2008; Namountougou *et al.*, 2012). Em *A. arabiensis* foram também já descritas as duas mutações *kdr*, em populações do Burkina Faso, Tanzânia e Benin (Diabaté *et al.*, 2004; Kulkarni *et al.*, 2006; Djègbè *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2012a; Jones *et al.*, 2012b).

Para além da importância das mutações descritas anteriormente, uma outra identificada em *A. gambiae* e *A. coluzzii* e que consiste na substituição de um resíduo de asparagina por tirosina na posição 1575 do gene (N1575Y), é associada a mecanismos de compensação da perda de *fitness* que a presença do alelo 1014F acarreta em mosquitos, na ausência de pressão seletiva. Por outro lado, parece também conferir uma resistência adicional aos inseticidas (Jones *et al.*, 2012a).

Estes resultados indicam de um modo geral uma rápida dispersão das mutações *kdr* nos principais vetores de malária do complexo *A. gambiae*, representando assim uma ameaça para a implementação sustentável de programas de controlo.

1.6. Malária na Guiné-Bissau

A malária é um dos principais problemas de saúde pública na Guiné-Bissau. Esta doença encontra-se dispersa em todo o país sendo considerada mesoendémica a holoendémica, apresentando um pico de transmissão no final da época das chuvas (Outubro-Novembro) (Arez *et al.*, 2003; Dabiré *et al.*, 2008). Estudos anteriores reportaram taxas parasitárias de 44-79%, em regiões rurais, com *P. falciparum* a ser a espécie predominante (Jaenson *et al.*, 1994; Arez *et al.*, 2003). A situação tende a ser diferente em áreas urbanas e pode ter mudado nos últimos anos, tendo sido reportadas prevalências de malária de 7%, indicando um decréscimo relativamente a anos anteriores (Ursing *et al.*, 2014).

Como medidas de prevenção e tratamento, existe uma ampla utilização de redes mosquiteiras que, no entanto, são maioritariamente não impregnadas (84-92%), sendo recomendado desde 2006 a combinação artemeter-lumefantrina como primeira linha de tratamento (Rodrigues *et al.*, 2008; WHO, 2013). No entanto, e apesar do primeiro caso

de resistência à cloroquina datar do início dos anos 90 do século XX (Gonçalves *et al.*, 1996), este fármaco é ainda frequentemente utilizado, juntamente com a sulfadoxina-pirimetamina como segunda escolha (Rodrigues *et al.*, 2008).

1.6.1. Complexo *Anopheles gambiae* na Guiné-Bissau

A Guiné-Bissau caracteriza-se pela ocorrência de três regiões ecológicas ou biótopos principais: i) região Litoral (costeira), caracterizada por terras de relevo pouco pronunciado, afetadas pelas alterações das marés, terrenos agrícolas irrigados (*e.g.* arrozais) e floresta de mangal, onde estão disponíveis criadouros larvares de águas salobras ii) região Central, onde se verifica a presença de densas florestas com vegetação de folha perene iii) região Interior, mais árida e onde prevalece a floresta de savana, fragmentada com vegetação de folha caduca e mato (Gonçalves *et al.*, 1996; Palsson *et al.*, 2004; Dabiré *et al.*, 2008; Nwakanma *et al.*, 2013). A presença dos diferentes biótopos, bem como as características bionómicas inerentes a cada espécie de mosquito podem influenciar a distribuição dos vetores.

De fato, verificou-se em levantamentos entomológicos anteriores a presença de três espécies do complexo *A. gambiae*, nomeadamente *A. gambiae s.s.*, *A. melas* e *A. arabiensis*, embora com distribuição geográfica distinta (Petrarca *et al.*, 1983; Jaenson *et al.*, 1994; Fonseca *et al.*, 1996; Dabiré *et al.*, 2008; Marsden *et al.*, 2011). A espécie *A. melas* é encontrada preferencialmente na região litoral devido à sua preferência por criadouros de águas salobras, diminuindo a sua abundância em ambiente urbano, (mesmo na região litoral), no interior de floresta e nas regiões de savana. (Dabiré *et al.*, 2008). *Anopheles arabiensis* é uma espécie adaptada a ambientes mais áridos, encontrando-se preferencialmente nas regiões de savana no interior. *Anopheles gambiae* e *A. coluzzii* são as espécies do complexo que aparentam ter uma distribuição mais ampla e maior abundância no país (Petrarca *et al.*, 1983; Jaenson *et al.*, 1994; Dabiré *et al.*, 2008; Marsden *et al.*, 2011). É de salientar que alguns dos estudos prévios disponíveis decorreram anteriormente à distinção entre as formas moleculares (*i.e.* atualmente designadas de *A. gambiae* e *A. coluzzii*). Também nestes estudos as localidades prospetadas localizam-se principalmente na região litoral e insular (*i.e.* arquipélago dos Bijagós). Contudo, verificou-se que as duas espécies ocorrem em

simpatria em particular na região litoral (Dabiré *et al.*, 2008; Marsden *et al.*, 2011; Nwakanma *et al.*, 2013).

Ao contrário do que se verifica na maior parte da África Ocidental onde *A. coluzzii* e *A. gambiae* ocorrem em simpatria, foram observados elevados níveis de hibridação entre estas espécies na região litoral da Guiné-Bissau (Oliveira *et al.*, 2008; Nwakanma *et al.*, 2013). Nesta região, foram reportadas taxas de híbridos entre 5% e 42% (Oliveira *et al.*, 2008; Nwakanma *et al.*, 2013) e estes estudos sugerem que esta região se encontra no centro de uma zona de contato secundário entre *A. coluzzii* e *A. gambiae*, que se localiza no extremo ocidental de África e envolve regiões costeiras da Gâmbia, Senegal, Guiné-Bissau e Guiné-Conacri (Caputo *et al.*, 2011; Nwakanma *et al.*, 2013)

Existem poucos estudos sobre a resistência dos vetores aos inseticidas no país. No entanto, a mutação *kdr* L1014F foi já detetada em baixa frequência na capital Bissau e numa localidade do interior (Gabú). Esta mutação foi identificada em *A. gambiae* em Gabú e em *A. gambiae* e *A. coluzzii* em Bissau (Dabiré *et al.*, 2008). Não existem ainda dados sobre a presença da mutação *ace-1* em populações do complexo *A. gambiae* da Guiné-Bissau.

2. OBJETIVOS

Na Guiné-Bissau, os vetores de malária *A. coluzzii* e *A. gambiae* ocorrem em simpatria com *A. arabiensis* e *A. melas*. A distribuição geográfica destes vetores pode ser determinada pelas características bionômicas de cada espécie e pela presença dos diferentes biótopos no país (Dabiré *et al.*, 2008; Marsden *et al.*, 2011). No entanto, algumas das descrições efetuadas sobre a distribuição das espécies do complexo *A. gambiae* na Guiné-Bissau são anteriores à distinção entre formas moleculares (Petrarca *et al.*, 1983; Jaenson *et al.*, 1994; Fonseca *et al.*, 1996) e, em estudos mais recentes, a caracterização é maioritariamente efetuada na região litoral (Dabiré *et al.*, 2008; Marsden *et al.*, 2011; Nwakanma *et al.*, 2013), pelo que as possíveis diferenças associadas à transição entre biótopos se encontram por clarificar.

Nas regiões central e ocidental Africanas é frequente a ocorrência em simpatria das espécies *A. coluzzii* e *A. gambiae*, sendo raro a ocorrência de híbridos entre ambas (della Torre *et al.*, 2005). Porém, a exceção parece ser o extremo ocidental Africano onde se verificam elevadas taxas de hibridação, em particular na Guiné-Bissau (Oliveira *et al.*, 2008; Nwakanma *et al.*, 2013). Este fator pode ser indicativo da ocorrência de uma zona de contato secundário, sendo importante avaliar a extensão geográfica onde ocorre este fenómeno, dado que pode ter influência nos padrões de transmissão de malária, nomeadamente na dispersão de genes de interesse como os associados à resistência a inseticidas (*e.g.* presença de alelos *kdr*) ou à suscetibilidade aos parasitas de malária (Nwakanma *et al.*, 2013).

Para além da sua abundância relativa, as diferenças bioecológicas e comportamentais entre espécies conferem diferentes graus de importância na transmissão de malária (White *et al.*, 2011b). Sendo *A. gambiae* e *A. coluzzii* espécies adaptadas ao ambiente peridoméstico em conformidade com os fortes padrões endofílicos e preferências antropofílicas, *A. arabiensis* o membro do complexo com maior plasticidade bioecológica e comportamental, geralmente definido como mais exofágico e exofílico do que *A. gambiae* e *A. coluzzii* evidenciando ainda um oportunismo em termos de preferências hemáticas e *A. melas* considerado um vetor secundário (Sinka *et al.*, 2010; White *et al.*, 2011b), torna-se importante perceber de que forma parâmetros entomológicos de importância médica como as preferências hemáticas e as taxas esporozoíticas variam nestas populações, refletindo a sua importância na transmissão de malária.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram:

1. Caracterizar a distribuição geográfica das espécies do complexo *A. gambiae* na Guiné-Bissau, em particular de *A. coluzzii* e *A. gambiae*, ao longo de um transeito Oeste-Este que percorre os três biótopos principais distintos do país (litoral, floresta e savana).
2. Avaliar a distribuição de mutações associadas à resistência aos inseticidas nas populações do complexo *A. gambiae*, nomeadamente:
 - a. Mutações *kdr* associadas com a resistência a inseticidas piretróides e DDT.
 - b. Mutações no gene *ace-1* associadas à resistência a carbamatos e organofosfatos.
3. Comparar entre espécies e populações do complexo *A. gambiae* parâmetros entomológicos com importância na transmissão de malária, nomeadamente:
 - a. O grau de antropofilia.
 - b. As taxas esporozoíticas de *P. falciparum*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da República da Guiné-Bissau

A República da Guiné-Bissau é um país da costa ocidental Africana que faz fronteira a norte com o Senegal, a Este e Sudeste com a República da Guiné-Conacri e a Oeste está delimitada pelo oceano Atlântico (Figura 7).



Figura 7 – Localização geográfica da República da Guiné-Bissau, (Adaptado de <http://www.portugues.rfi.fr/>).

Com uma área de 36.125 km², tem uma população estimada em 1,66 milhões de residentes repartidos por nove regiões. A densidade populacional é aproximadamente de 34 habitantes/km². Além do território continental, integra ainda cerca de oitenta ilhas que constituem o Arquipélago dos Bijagós (INEC, 2011).

A maior parte do território da Guiné-Bissau é plana e as elevações não ultrapassam 50 metros, exceto o interior Este, onde se atinge elevações até 300 metros. O litoral é marcado pela existência de redes complexas de rias e pântanos colonizadas por floresta de mangal e por planícies cultivadas (*e.g.* caju, arroz) que se estendem até ao interior onde começam a aparecer planaltos pouco elevados (Palsson *et al.*, 2004; Biai, 2009)

O clima é tropical quente e húmido (classificação Köppen Aw, Kottek *et al.*, 2006). Ocorrem duas estações distintas: a estação das chuvas, que se estende de meados de Maio até meados de Outubro, com maior pluviosidade em Julho e Agosto; e a estação seca, correspondendo aos restantes meses do ano. As temperaturas são elevadas durante todo o ano, sendo os meses de Dezembro e Janeiro os mais frescos (Rodrigues *et al.*, 2008; Dabiré *et al.*, 2008).

3.2. Colheitas entomológicas

Em Outubro de 2010, uma equipa composta por investigadores e técnicos do Instituto Nacional de Saúde (INASA, Guiné-Bissau), do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, Portugal) e da Universidade de Roma “La Sapienza” (Itália) conduziram uma pesquisa entomológica na República da Guiné-Bissau. A colheita de mosquitos adultos foi efetuada em 12 localidades situadas ao longo de um transeto Oeste-Este (Figura 8.1) e que percorreu os três biótopos principais distintos (Tabela 1).

Tabela 1 – Características das localidades prospetadas.

Região	Local	Coordenadas Geográficas	Meio social	Biótopo principal
Litoral	Quinhamel	11,884222 / -15,856500	Rural	Terras baixas e planas
	Prábis	11.802167 / -15.738694	Periurbano	afetadas pelas alterações de
	Safim	11.956889 / -15.649222	Periurbano	marés. Terrenos agrícolas
	Antula	11.891222 / -15.581917	Periurbano	irrigados, pântanos, floresta
	Nhacra	11.960306 / -15.537028	Rural	de mangal.
Centro	Mansoa	12.076028 / -15.321194	Periurbano	
	Mandingará	12.171361 / -15.192167	Rural	Floresta tropical densa com
	Mansabá	12.289667 / -15.170972	Rural	vegetação de folha perene
	Gambaná	12.051944 / -14.902417	Rural	
Interior	Comuda	12.198250 / -14.628142	Rural	Floresta de savana
	Leibala	12.271750 / -14.222444	Periurbano	fragmentada com vegetação
	Canjufa	12.435139 / -14.125500	Rural	de folha caduca e mato.

Em todas as localidades, verificou-se que a generalidade das habitações era construída maioritariamente em adobe, com chão de terra batida e telhado de colmo ou zinco. A presença de animais domésticos é comum, por vezes no interior das habitações, embora não se tenha efetuado um estudo sistemático sobre a disponibilidade de hospedeiros alternativos aos humanos. Nas localidades amostradas, as principais atividades agrícolas desenvolvidas são as culturas de arroz, cajú, amendoim, algodão e milho. Estas atividades agrícolas envolvem a aplicação de inseticidas piretróides na região, em substituição do anteriormente utilizado DDT (Dabiré *et al.*, 2008).



Figura 8 – **1)** Mapa de cobertura do solo (FAO, 2009), com os locais das colheitas entomológicas assinalados: **A:** Quinhamel; **B:** Prábis; **C:** Safim; **D:** Antula (Bissau); **E:** Nhacra; **F:** Mansoa; **G:** Mandingará; **H:** Mansabá; **I:** Gambaná; **J:** Comuda; **K:** Leibala; **L:** Canjufa; **2)** Colheitas intradomiciliares de mosquitos em repouso; **3)** Colheitas intradomiciliares de mosquitos com armadilhas CDC; **4)** Colheitas de extradomiciliares de mosquitos em repouso.

Foram efetuadas colheitas de mosquitos recorrendo-se a dois métodos de captura (Figura 8.3): i) armadilhas CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Sudia & Chamberlain, 1988) – as armadilhas foram colocadas nos quartos, próximo das camas onde os habitantes dormiam protegidos por redes mosquiteiras e a colheita foi efetuada durante a noite por 12 horas (19h-07h); ii) Colheitas manuais de mosquitos em repouso – colheitas intradomiciliares (IR) e extradomiciliares (OR) com recurso a aspiradores mecânicos e lanternas (Figura 8.2 e 8.4), sendo efetuadas durante a manhã (07h-10h).

Todos os mosquitos colhidos nas armadilhas CDC foram identificados e separados por espécie, ou complexo de espécies, através da observação de caracteres morfológicos ao estereomicroscópio e com recurso à chave de identificação de Gillies & De Meillon (1968). Os mosquitos foram depois individualizados e preservados em

tubos com sílica gel, à temperatura ambiente, até posterior utilização em laboratório. Subamostras de mosquitos identificados como *A. gambiae* s.l. foram dissecadas, separando-se a cabeça e tórax para detecção da proteína circunsporozoítica de *P. falciparum* nas glândulas salivares dos mosquitos através da técnica de ELISA (CSP-ELISA, Burkot *et al.*, 1984), sendo as restantes partes do corpo (abdômen, patas e asas) utilizadas para extração de ADN e análises moleculares.

Os mosquitos colhidos em repouso foram transportados vivos numa caixa isotérmica até ao laboratório. Aí, os mosquitos foram identificados e a refeição sanguínea de fêmeas recém-alimentadas foi retirada para papel de filtro (Whatman nº1) e conservada à temperatura ambiente para detecção da sua origem através da técnica de ELISA (Simões *et al.*, 1995).

3.3. Extração de ADN

Procedeu-se à extração do ADN, usando o mosquito ou parte dele (no caso das subamostras usadas para CSP-ELISA e de fêmeas recém-alimentadas), através de um protocolo adaptado de Collins *et al.* (1988). Homogeneizou-se cada indivíduo em 100µl de tampão de lise (Tris-HCl 0,1M pH 8,0; NaCl 0,08M; EDTA 0,06M pH 8,0; SDS 0,5%, sacarose 0,16M em ddH₂O), em tubos de 1,5ml. Para inibir a atividade de ADNases, seguiu-se uma incubação a 65°C durante 30 minutos. Precipitaram-se as proteínas com a adição de 14µl de uma solução de acetato de potássio 8M e incubação em gelo durante 30 minutos. Após centrifugação a 12000xg durante 10 minutos, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Procedeu-se à precipitação do ADN com 200µl de etanol absoluto seguido de uma incubação a -20°C durante 1 hora. Submeteram-se as amostras a uma centrifugação de 12000xg durante 15 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Cada *pellet* de ADN foi lavado com 200µl de etanol a 70%, seguindo-se uma centrifugação a 12000xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e os resíduos de etanol evaporados num liofilizador (Concentrator 5031, EppendorfTM) durante cerca de 30 minutos. Por fim, suspendeu-se o ADN com 100µl de ddH₂O e 100µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). Nos casos onde apenas foi utilizada parte do corpo do mosquito, a suspensão foi feita com 25µl de ddH₂O e 25µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). Durante o

processo de extração de ADN foram utilizados controlos negativos (*i.e.* sem material biológico) de modo a despistar possíveis contaminações.

3.4. Identificação das espécies do complexo *A. gambiae*

Foi usada uma técnica de PCR-RFLP (aqui designada por IGS-PCR), descrita por Fanello *et al.* (2002), para a identificação de espécies do complexo *A. gambiae*. O PCR para a identificação das espécies foi realizado utilizando um *primer* universal (UN), que é comum entre as espécies do complexo, e um *primer* específico para cada uma das seguintes espécies: *A. gambiae* s.s. (GA), *A. arabiensis* (AR) e *A. melas/A. merus* (ML). Estes *primers* permitem a amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos, específicos de cada espécie, na região IGS do rADN (Figura 9). A mistura de reação, com 10µl de volume total, foi composta por 1µl de ADN molde (diluído 1:10 a partir do stock); Tampão *Green GoTaq® Flexi* (Promega) a 1X; 2,5mM de MgCl₂ (Promega); 0,2mM de cada dNTP (Promega); 0,83µM de *primer* UN [5'-GTG TGC CCC TTC CTC GAT GT-3']; 0,42µM de *primer* GA [5'-CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT-3']; 1,25µM de *primer* AR [5'-AAG TGT CCT TCT CCA TCC TA-3']; 0,83µM de *primer* ML [5'-TGA CCA ACC CAC TCC CTT GA-3'] e 0,25U de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega) (Scott *et al.*, 1993; Fanello *et al.*, 2002). A reação de PCR realizou-se em 30 ciclos, cada um composto por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 50°C e 30 segundos de extensão a 72°C. Seguiu-se um período de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Seguidamente, os produtos amplificados foram sujeitos a uma digestão enzimática a 37°C durante 4 horas, sendo que cada mistura de reação, de 20µl de volume total, foi composta por 10µl de produto amplificado; Tampão C (Promega) a 1X; 0,1mg/ml de BSA (Promega) e 2U de enzima *Hha* I (Promega). Este passo permitiu a distinção das espécies *A. gambiae* e *A. coluzzii*, bem como a deteção de híbridos entre as duas espécies. As espécies *A. coluzzii*, *A. melas*, *A. arabiensis* apresentam um padrão caracterizado por uma única banda de tamanho 367pb, 435pb e 292pb, respetivamente. *Anopheles gambiae* caracteriza-se por um padrão de bandas composto por dois fragmentos (257pb e 110pb), devido à presença da sequência reconhecida pela enzima de restrição *Hha* I (Figura 9).

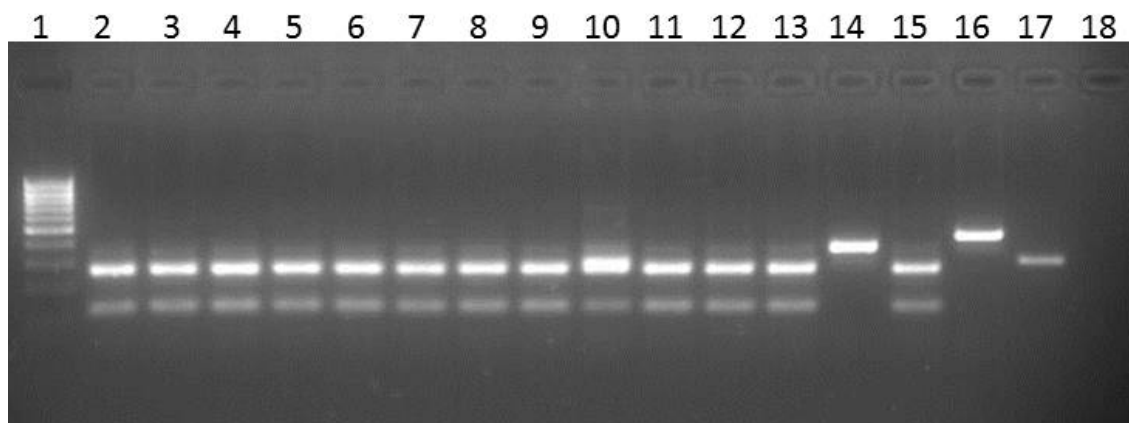


Figura 9 – Identificação de espécies do complexo *A. gambiae*, por IGS-PCR. **1** – Marcador de peso molecular de 100pb; **2 a 13** – amostras de campo identificadas como *A. gambiae*; **14**- *A. coluzzii*; **15**- *A. gambiae*; **16**- *A. melas*; **17**- *A. arabiensis*; **18**- Controlo negativo de PCR.

3.5. Identificação de *A. gambiae* e *A. coluzzii* por SINE-PCR

Além da técnica de IGS-PCR, foi ainda utilizado um ensaio de PCR complementar, para a diferenciação de *A. gambiae* e *A. coluzzii*, aqui designado por SINE-PCR (Santolamazza *et al.*, 2008a). Procedeu-se à amplificação de um polimorfismo de inserção SINE de 200pb que, tal como o polimorfismo IGS, também se localiza na região centromérica do cromossoma X, sendo a distância entre ambos de 1Mb (Santolamazza *et al.*, 2008a). O SINE é um retrotransposição que se apresenta fixo em *A. coluzzii* e ausente em *A. gambiae*, permitindo a obtenção de um padrão de bandas de PCR distinto para cada espécie e para os híbridos (Figura 10). De acordo com o protocolo descrito por Santolamazza *et al.* (2008a), efetuou-se uma mistura de reação, com um volume total de 25µl, composta por 1µl de ADN molde; Tampão *Green GoTaq® Flexi* (Promega) a 1X; 5mM de MgCl₂ (Promega); 0,32mM de cada dNTP (Promega); 0,072µM do *primer* S200-f [5'-TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA-3']; 0,072µM do *primer* S200-r [5'-CGC TTC AAG AAT TCG AGA TAC-3']; e 0,9U de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega). A reação de PCR incluiu uma desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, seguindo-se 35 ciclos, cada um composto por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 54°C e 1 minuto de extensão a 72°C. Seguiu-se um período de extensão final a 72°C por 10 minutos.

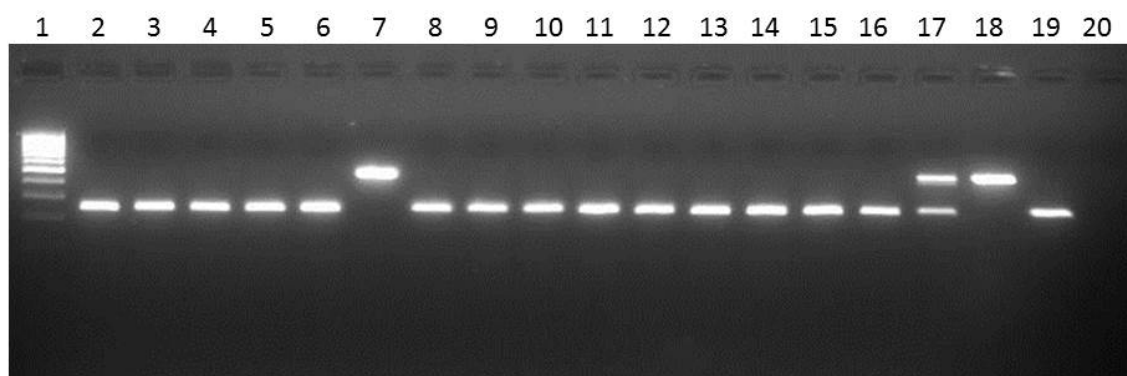


Figura 10 – Padrão de bandas numa eletroforese obtidas pelo SINE-PCR em *A. gambiae s.l.* demonstrando a presença ou ausência do polimorfismo de inserção nas espécies *A. coluzzii* e *A. gambiae* respetivamente. **1** – Marcador de peso molecular de 100pb; **20** – Controlo negativo de PCR; **7 e 18** – *A. coluzzii*; **17** – híbrido *A. coluzzii/A. gambiae*; As restantes amostras foram identificadas como *A. gambiae*.

No seguimento do trabalho desenvolvido por Santolamazza *et al.* (2011), onde se recomenda a utilização de mais do que um método para identificar *A. gambiae* e *A. coluzzii*, em áreas onde ocorram híbridos, utilizou-se a informação obtida nos dois ensaios (IGS-PCR e SINE-PCR) para a identificação destas espécies. Assim, foram considerados como pertencentes às espécies *A. gambiae* ou *A. coluzzii* os exemplares que apresentassem concordância para ambos os marcadores, sendo os restantes considerados como indivíduos híbridos.

3.6. Detecção de mutações *kdr*

Para a deteção das mutações *kdr* (L1014S e L1014F) foi utilizada a técnica de PIRA-PCR (*Primer Introduced Restriction Analysis*) de Janeira *et al.* (2008). Esta técnica baseia-se na introdução de um local de restrição artificial através de um *mismatch* de nucleótido único, geralmente situado na extremidade 3' do *primer*, próximo da mutação de interesse, permitindo a distinção entre o alelo selvagem 1014L (TTA) dos alelos mutantes 1014S (TCA) e 1014F (TTT) por restrição enzimática do produto amplificado (Ke *et al.*, 2001; Janeira *et al.*, 2008). Assim, foram efetuadas duas reações de PIRA-PCR, em separado, para a identificação das mutações L1014S e

L1014F, respetivamente, obtendo-se um padrão de bandas distinto, cujo perfil se apresenta na figura 11.

Para deteção da mutação L1014S foi realizado um PCR cuja mistura de reação de 20µl foi composta por 1µl de ADN molde, Tampão *Green GoTaq® Flexi* (Promega) a 1X; 2,5mM de MgCl₂ (Promega); 0,2mM de cada dNTP (Promega); 0,25µM do *primer* PIRA1014S-f [5'-CTT GGC CAC TGT AGT GAT AGG AAA cT-3'] e 0,25µM do *primer* PIRA1014-r [5'-ACA TGG TGC TAG TGG ATT GTA C-3']; e 1U de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega). A reação de PCR iniciou-se com uma desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 56°C e 30 segundos de extensão a 72°C. Seguiu-se uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Os produtos amplificados foram incubados a 25°C por 16h com a enzima de restrição *BspCNI* numa mistura de reação de 20µl, que incluiu 5µl do produto amplificado, Tampão 1 (NEB®) a 1X, 0,32mM de *S-adenosylmethionine* (NEB®), BSA a 1X, e 0,5U de enzima *BspCNI* (NEB®).

Para a deteção da mutação L1014F, foram usados os *primers* PIRA1014F-f [5'-CTT GGC CAC TGT AGT GAT AGG AAA TaT-3'] e PIRA1014-r acima descrito, numa reação de PCR de 15µl por amostra, contendo 1µl de ADN molde, Tampão *Green GoTaq® Flexi* (Promega) a 1X; 2mM de MgCl₂ (Promega); 0,2mM de cada dNTP (Promega), 0,33mM de cada *primer* e 1U de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega). A reação de PCR iniciou-se com uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos compostos por uma desnaturação a 94°C, *annealing* a 55°C e extensão a 72°C, todos por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para a reação de restrição enzimática, 10µl de cada produto amplificado foi misturado com Tampão *SspI* (NEB®) a 1X e 1U de enzima *SspI*(NEB®), num volume final de 20µl. As digestões decorreram a 37°C por 16h.

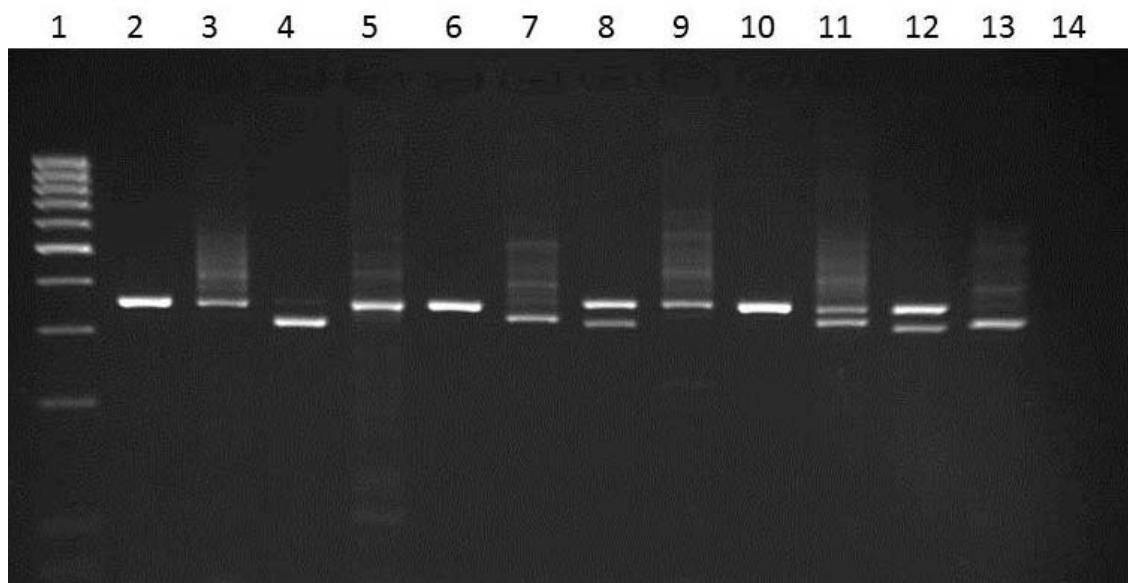


Figura 11 – Padrão de bandas numa eletroforese obtidas pelo PIRA-PCR na detecção de mutações *kdr*. A partir da linha 2 e até à linha 13, cada duas linhas corresponde ao mesmo indivíduo, sendo que as bandas das linhas pares correspondem ao ensaio de PIRA-PCR para detetar a mutação L1014S e as linhas ímpares ao ensaio de detecção da mutação L1014F. **1**- Marcador de peso molecular de 100pb; **2 e 3** - homozigótico 1014L (TTA-TTA); **4 e 5** - homozigótico 1014S (TCA-TCA); **6 e 7** - homozigótico 1014F (TTT-TTT); **8 e 9** - heterozigótico 1014L/S (TTA-TCA); **10 e 11** - heterozigótico 1014L/F (TTA-TTT); **12 e 13** - heterozigótico 1014S/F (TCA-TTT); **14** – Controlo negativo de PCR.

3.7. Detecção de mutações no gene *ace-1*

Para a detecção da mutação G119S no gene *ace-1* foi adotado o protocolo de Weill *et al.* (2003). Procederam-se a ensaios de PCR-RFLP, onde é realizada a amplificação por PCR de um fragmento de 541pb situado no exão 3 do gene *ace-1*, contendo o codão 119. O fragmento amplificado apresenta polimorfismos que são detetados pela enzima de restrição *AluI*, diferenciando os alelos resistentes e sensíveis, como descrito na figura 12.

Assim, para a detecção da mutação G119S foi realizado um PCR, cuja mistura de reação de 25µl era composta por 1µl de ADN molde, Tampão *Green GoTaq® Flexi* (Promega) a 1X; 1,5mM de MgCl₂ (Promega); 0,2mM de cada dNTP (Promega); 0,4µM do *primer* ExAGdir (5'-GAT CGT GGA CAC CGT GTT CG-3'); 0,4µM do *primer* ExAGrev (5'-AGG ATG GCC CGC TGG AAC AG-3'); 0,02mg/ml de BSA e 0,25U de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega). A reação de PCR iniciou-se com

uma desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por uma desnaturação a 94°C, *annealing* a 62°C e extensão a 72°C, todos por 30 segundos, seguindo-se uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Em seguida, 5µl de cada produto amplificado foram sujeitos a uma reação de digestão enzimática a 37°C durante 4 horas, num volume total de 20µl contendo Tampão Tango™ (Thermo Scientific™) a 1X e 2,5U de enzima *AluI* (Thermo Scientific™).

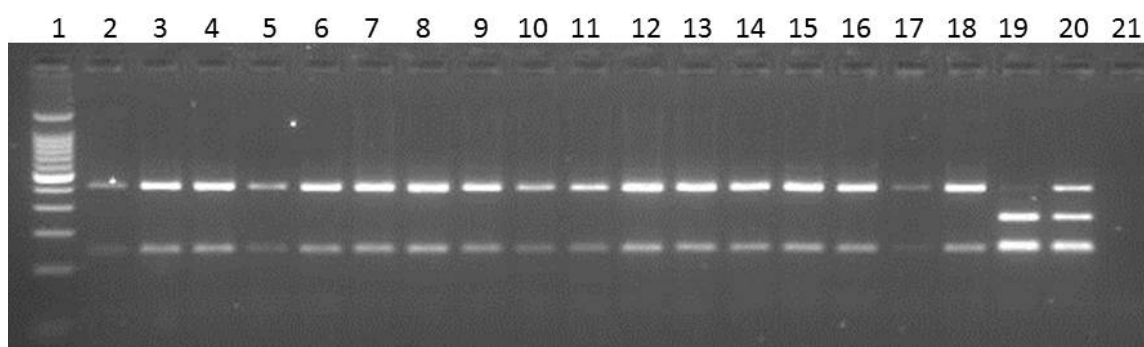


Figura 12- Padrão de bandas obtido pelo PCR-RFLP na deteção da mutação G119S **1-** Marcador de peso molecular de 100pb. **2 a 18** – Amostras homozigóticas suscetíveis (SS). **19** – Amostra homozigótica resistente (RR). **20-** Amostra heterozigótica (RS). **21-** Controlo negativo de PCR.

3.8. Deteção de fragmentos em gel de agarose

A separação dos produtos de PCR resultantes do protocolo de SINE-PCR e dos produtos digeridos enzimaticamente resultantes dos protocolos de IGS-PCR, deteção de mutações *kdr* e *ace-1*, foi efetuada por eletroforese horizontal em gel de agarose 2% (Seakem® LE Agarose, Lonza) em TBE 1X (TBE *buffer* 10X, Applichem) corado com brometo de etídeo 10mg/ml (Sigma-Aldrich®). Foram aplicados no gel 15µl de amostra e 5µl de marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific™). O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 130V durante 60 minutos e as bandas foram visualizadas num transiluminador de luz UV e fotografadas num sistema Uvidoc (Uvitec™), (Figuras 9-12).

3.9. ELISA para a identificação de refeições sanguíneas em mosquitos

Para determinar a origem das refeições sanguíneas colhidas de fêmeas recém-alimentadas capturadas em repouso nas localidades amostradas na Guiné-Bissau, utilizou-se um protocolo de “two-sites” ELISA adaptado de Simões *et al.* (1995). As refeições sanguíneas foram testadas para a presença de imunoglobulinas G (IgG) de sangue humano, de ave (galiformes), bovino, caprino/ovino e canino. Esta seleção de anticorpos teve por base a observação efetuada no terreno de possíveis hospedeiros alternativos aos humanos, nas localidades amostradas. Com esta análise foi possível calcular o Índice de Antropofilia – IA (*i.e.* proporção de refeições sanguíneas em humanos no total de amostras testadas) para cada espécie e em cada localidade.

Para a realização deste ensaio, um pedaço de *ca.* 2mm² de amostra conservada em papel de filtro foi cortado e eluído em 2ml de PBS-T (0,01M tampão fosfato, pH7,4; Tween[®]20, 0,05%), durante a noite a 4°C. Para evitar a contaminação cruzada entre amostras, a tesoura e a pinça utilizadas eram lavadas entre cada amostra, numa solução de hipoclorito 10%, enxaguadas e secas.

Foi utilizada uma microplaca de 96 alvéolos de fundo plano (Greiner Bio-One[®]) por cada anticorpo testado, sendo numa primeira fase sensibilizada com 100µl do anticorpo correspondente (Sigma-Aldrich[®]), numa concentração de 4µg/ml previamente diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH=9,6). As placas foram incubadas a 4°C durante a noite.

No dia seguinte, a solução de revestimento foi removida e as placas lavadas três vezes com 150µl de PBS-T. Em seguida, foram adicionados 150µl de uma solução de leite em pó 10% em PBS como solução de bloqueio. Este passo foi feito para todas as placas com a exceção das que foram revestidas com anticorpo para deteção de IgG's bovino e ovino/caprino. Nestes casos foi adicionado igual volume de uma solução de soro humano a diluído a 1% em PBS.

Todas as placas permaneceram à temperatura ambiente por 60 minutos, após o qual se procedeu à remoção da solução de bloqueio e a uma nova série de 3 lavagens com 150µl de PBS-T. Foram adicionados 100µl de cada eluato de sangue a cada um dos alvéolos. Dois controlos positivos (sangue homólogo) e 14 controlos negativos (sangue heterólogo) foram também adicionados em todas as placas. Incubaram-se as placas

durante 2 horas a 37°C, após o qual se removeram as amostras e se lavou a placa por três vezes com PBS-T.

Um novo conjunto de anticorpos específicos para o respetivo IgG, agora conjugados com a enzima peroxidase (MoAbs*), foram diluídos de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich®). Para os MoAbs* específicos de bovino e ovino/caprino, procedeu-se previamente a uma incubação durante a noite a 4°C com soro adsorvente num volume 50x superior ao volume do anticorpo conjugado. O soro de ovino foi usado para os MoAbs* específicos de bovino e o soro bovino para os MoAbs* específicos de ovino/caprino. Após incubação, estes anticorpos foram centrifugados a 12000xg por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi então diluído em PBS-T para obtenção da concentração recomendada pelo fabricante. Em cada alvéolo da microplaca, foram adicionados 100µl do respetivo MoAbs*, seguindo-se uma incubação de 1h à temperatura ambiente.

Após a incubação, foram descartados os MoAbs*, e fez-se uma nova lavagem dos alvéolos com 150µl de PBS-T, repetindo-se este passo por três vezes. Seguiu-se a adição de 100µl em cada poço de uma solução a 0,1% de peróxido de hidrogénio em 5AS (Ácido 5-aminosalicílico, Sigma-Aldrich®). As placas com este substrato enzimático foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos no escuro, sendo a reação posteriormente parada através da adição de 50µl de NaOH 4M.

Os valores de absorvância foram obtidos num leitor de placas de ELISA (Anthos 2010®, Anthos Labtec Instruments) a um comprimento de onda de 492nm. Os valores de “*cut-off*”, para um intervalo de confiança de 95%, foram obtidos pela soma da média das absorvâncias dos controlos negativos com três vezes o valor do desvio padrão.

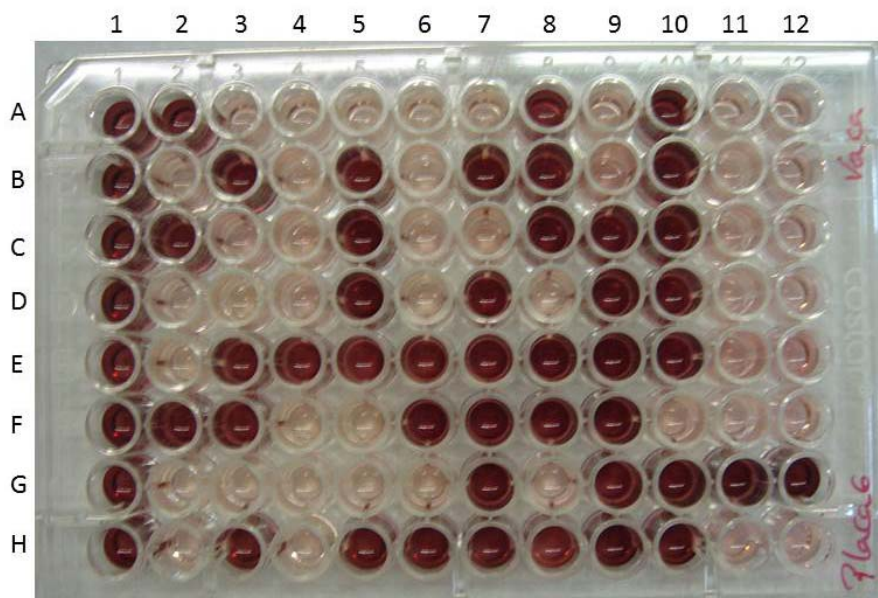


Figura 13 – Exemplo do padrão obtido na técnica de ELISA para determinação origem da refeição sanguínea. Fila 11 e 12 – Controlos negativos (claros) e controlos positivos (escuros).

3.10. ELISA para a deteção de esporozoítos

Para a pesquisa da proteína circunsporozoítica de *P. falciparum* (Pf-CSP) em mosquitos individuais, foi usada a técnica de “two-site” ELISA descrita por Burkot *et al.* (1984). Como a Pf-CSP é também expressa em oocistos maduros, apenas a cabeça e o tórax foram usados, para evitar a inclusão de mosquitos infetados com oocistos mas que eventualmente ainda não apresentem esporozoítos (*i.e.* a fase infetante).

O procedimento iniciou-se com a adesão a uma microplaca de ELISA de 96 alvéolos de fundo plano (Greiner Bio-One®) dos anticorpos monoclonais não conjugados (ou de revestimento) numa concentração de 4µg/ml e volume de 50µl por alvéolo. Este processo decorreu durante a noite a uma temperatura de 4°C. Após a incubação removeu-se a solução de revestimento, aplicando-se de seguida 200µl de tampão de bloqueio (0,5% Caseína e 0,1N NaOH em PBS, pH 7,5) a cada alvéolo. Seguiu-se uma incubação à temperatura ambiente durante uma hora, permitindo que todos os pontos de ligação que não foram preenchidos pelos anticorpos de revestimento ficassem inviáveis. Após a incubação, foi descartado o tampão de bloqueio e efetuou-se uma lavagem dos alvéolos com 200µl de PBS-T, repetindo-se este passo por três vezes.

Entretanto, os mosquitos (*i.e.* cabeça + tórax) foram macerados com setas plásticas em microtubos, com 200µl de solução de homogeneização composta por tampão de bloqueio e 0,5% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich®), um detergente não iónico e não desnaturante. Em seguida aplicaram-se 50µl de homogenado por alvéolo na placa de ELISA. Foi aplicado o mesmo volume dos controlos negativos (mosquitos *A. gambiae* não infetados, criados em insectário) e dos controlos positivos (mosquitos *A. gambiae* infetados experimentalmente com *P. falciparum*). Foram ainda utilizados antígenios recombinantes fornecidos pelo CDC (Atlanta, EUA) como controlos positivos. Foram aplicados 100µl (25pg/µl) do antígeno a partir do qual se efetuaram diluições seriadas numa coluna da placa de ELISA numa proporção de 1:1 com tampão de bloqueio, num volume final de 50µl por alvéolo.

Após uma incubação de duas horas à temperatura ambiente, os homogenados de mosquito foram aspirados e a placa foi lavada três vezes com PBS-T. Em seguida adicionou-se 50µl (1µg/ml) dos anticorpos monoclonais conjugados com peroxidase a cada alvéolo, tendo ficado a incubar durante uma hora. Posteriormente lavou-se a placa por três vezes com PBS-T, adicionando-se então 100µl da solução contendo o substrato da enzima peroxidase (ABTS + tampão fosfato-citrato 0,05 M, pH 5,0 + peróxido de hidrogénio 30%, Sigma-Aldrich®)

Após uma incubação de 30 minutos no escuro e à temperatura ambiente, observou-se mudança de cor nas amostras positivas (figura 14), e as absorvâncias foram medidas num leitor espectrofotométrico de microplacas (Anthos 2010®, Anthos Labtec Instruments). A leitura foi realizada a um comprimento de onda de 405nm. O valor de “*cut-off*”, para um intervalo de confiança de 95%, foi calculado através da soma entre a média das absorvâncias dos controlos negativos e três vezes o valor do desvio padrão.

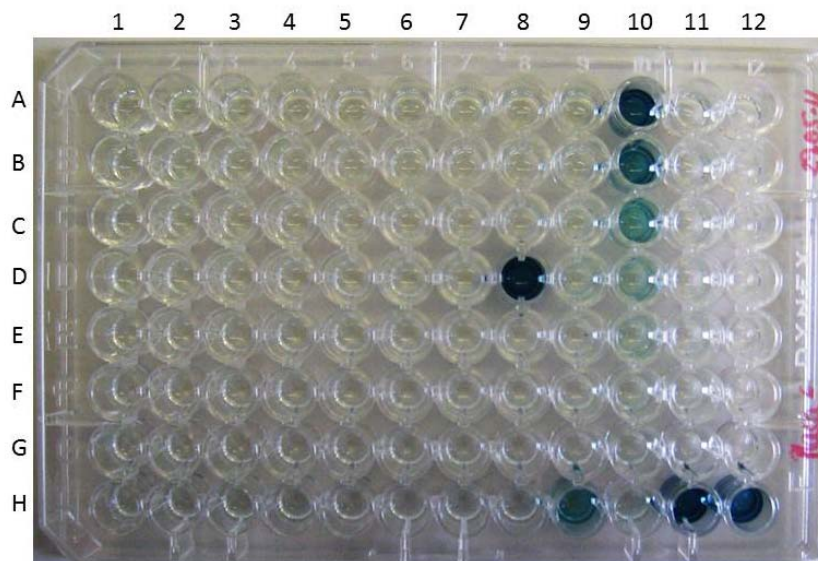


Figura 14 – Exemplo do padrão obtido na técnica de ELISA para detecção da proteína circunsporozoítica (CSP). **Posição 9H, 11H e 12H** – controles positivos (mosquitos infetados). **Fila 10** – Diluição seriada do controlo positivo (proteína CSP). **Fila 11 e 12, A a G** – Controlos negativos. **Posição 8D** - Amostra positiva para a presença da proteína CSP.

3.11. Análise estatística e tratamento dos resultados

As bases de dados contendo informação sobre espécie, genótipo para marcadores de resistência e resultados de ELISA (refeição sanguínea e CSP) por mosquito analisado foram construídas em ficheiros Microsoft Excel® v14.0. Este *software* foi ainda utilizado para o cálculo de médias aritméticas e respetivos desvios padrão para o cálculo dos valores de *cut-off* dos ensaios de ELISA.

As comparações estatísticas com base em tabelas de contingência, foram efetuadas utilizando o teste de Chi-Quadrado de Pearson (χ^2) (Sokal & Rohlf, 1981; Kirkwood, 1988). No entanto, o teste de Chi-Quadrado não deve ser utilizado para amostras pequenas, isto é, quando a frequência esperada de qualquer célula for inferior a 1 ou inferior a 5 em 20% das células. Nestas situações, foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Este teste calcula as probabilidades exatas da tabela de contingência e de todas as tabelas que possam ser obtidas com os mesmos totais das linhas e colunas. Estes testes estatísticos foram realizados com recurso ao *website* “VassarStats: Website for statistical computation” (Lowry, 1998). Neste estudo, o nível de significância utilizado foi de 5%, logo a H_0 (hipótese nula) foi rejeitada para valores de P (probabilidade) inferiores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação e distribuição das espécies do complexo *A. gambiae*

Um total de 2155 fêmeas *A. gambiae* s.l. capturadas em 12 localidades da Guiné-Bissau foram identificadas como pertencentes ao complexo *A. gambiae*. Destas, foi possível obter resultado de identificação molecular por IGS-PCR e SINE-PCR para um total de 2117 (98,2%) exemplares, 1570 provenientes de armadilhas CDC e 547 de colheitas em repouso.

Os resultados obtidos para a composição do complexo *A. gambiae* em cada localidade encontram-se esquematizados na figura 15 e detalhados numericamente na tabela A1 dos anexos.

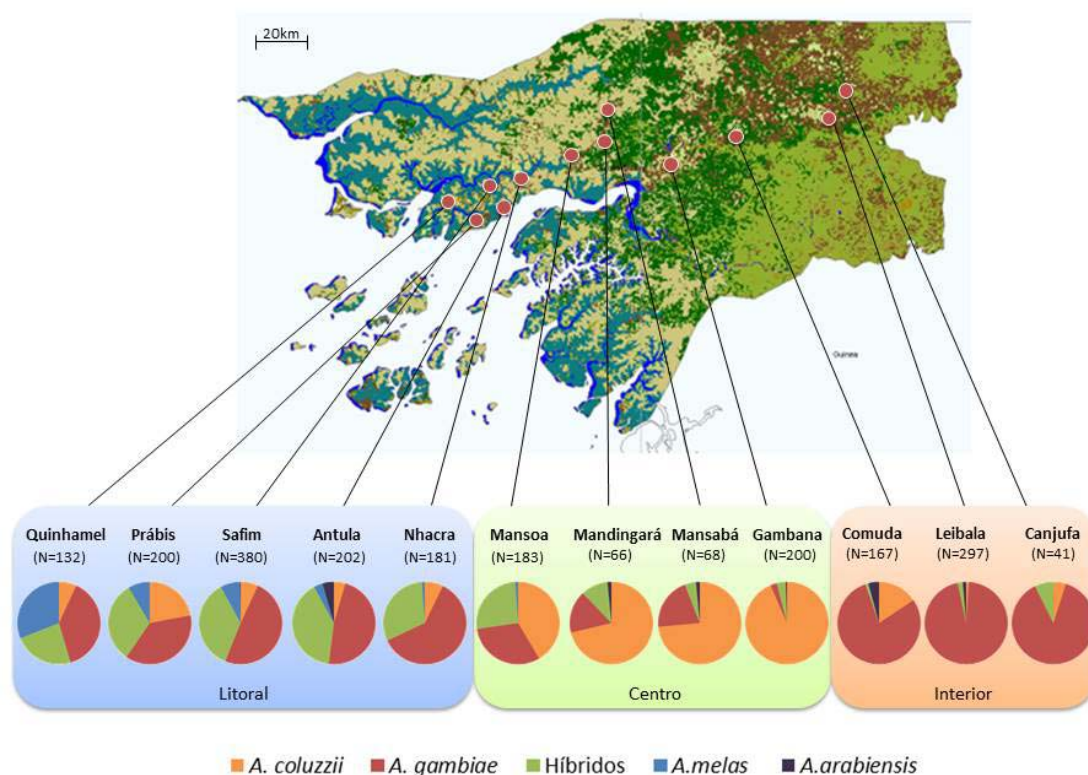


Figura 15 – Distribuição das espécies do complexo *A. gambiae* na Guiné-Bissau.

Na amostra total ($N=2117$), *A. gambiae* foi a espécie mais abundante, perfazendo 50% dos mosquitos identificados. *Anopheles coluzzii*, com 23% de indivíduos, foi a segunda espécie mais amostrada. *Anopheles melas* e *A. arabiensis* foram também identificados, mas com frequências bastante inferiores, 5% e 1%,

respetivamente. Foram ainda detetados 21% de indivíduos híbridos entre *A. coluzzii* e *A. gambiae*.

A distribuição das espécies do complexo *A. gambiae* ao longo do transeto permite distinguir três regiões geográficas em que a frequência relativa das espécies varia, e que parecem ter alguma concordância com os biótopos principais que o transeto percorreu, nomeadamente:

Região Litoral – Nesta região, onde se incluem as localidades de Quinhamel, Prábis, Safim, Antula e Nhacra, foram detetadas as espécies *A. melas*, *A. arabiensis*, *A. gambiae* e *A. coluzzii* em simpatria, bem como a ocorrência de híbridos. No entanto, a espécie mais abundante foi *A. gambiae* com 47% dos 1095 dos indivíduos amostrados nesta região. Observou-se ainda *A. melas* em todas as localidades, com destaque para Quinhamel, onde se verificou a maior abundância desta espécie (31%).

Região Central – Esta região, que inclui as localidades Mansoa, Mandingará, Mansabá e Gambaná, caracterizou-se pela predominância de *A. coluzzii*, que foi identificado em 69% dos 517 exemplares coletados nestas localidades. Gambaná foi a localidade onde esta espécie foi mais abundante, com 94% dos mosquitos identificados. Nesta região, verificou-se ainda a ocorrência de híbridos (12%), sendo no entanto menos abundantes comparativamente à região litoral (34%). Foram ainda identificados 87 indivíduos (17%) pertencentes à espécie *A. gambiae*, 3 indivíduos (1%) identificados como *A. arabiensis* e 2 indivíduos (1%) identificados como *A. melas*.

Região Interior – Nas localidades de Comuda, Leibala e Canjufa situadas nesta região, verificou-se uma ampla predominância de *A. gambiae* sobre as restantes espécies, com 90% dos 505 mosquitos identificados nesta região. Foram ainda identificados 31 indivíduos *A. coluzzii* (6%), 11 híbridos (2%) e 11 *A. arabiensis* (2%). Não foram identificados *A. melas*.

No que respeita à comparação entre os genótipos obtidos pelos marcadores IGS e SINE na identificação de *A. coluzzii* e *A. gambiae*, observou-se uma concordância em 90% na amostra total (Tabela 2). No entanto as diferenças entre marcadores foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 25,42$; d.f.=2; $P < 0,001$). O mesmo se verifica no grupo de amostras da região litoral, onde a concordância entre marcadores foi de 83%, tendo as diferenças sido estatisticamente significativas ($\chi^2 = 27,46$; d.f.=2; $P < 0,001$). Nas amostras colhidas no centro e interior do território, não se verificaram diferenças

significativas entre a identificação efetuada pelos dois marcadores (Centro: 94% de concordância, $\chi^2 = 3,00$; d.f.=2 $P=0,223$; Interior: 98% concordância, $\chi^2 = 3,04$; d.f.=2 $P=0,218$).

Tabela 2 – Resultados obtidos pela comparação entre os marcadores IGS e SINE na identificação de *A. coluzzii* e *A. gambiae*.

			SINE		
			<i>A. coluzzii</i>	híbridos	<i>A. gambiae</i>
IGS	Litoral (N=989)	<i>A. coluzzii</i>	101	24	7
		híbridos	1	204	118
		<i>A. gambiae</i>	5	10	519
	Centro (N=512)	<i>A. coluzzii</i>	360	9	0
		híbridos	5	34	17
		<i>A. gambiae</i>	0	0	87
	Interior (N=494)	<i>A. coluzzii</i>	31	1	0
		híbridos	1	2	6
		<i>A. gambiae</i>	1	0	452
	Total (N=1995)	<i>A. coluzzii</i>	492	34	7
		híbridos	7	240	141
		<i>A. gambiae</i>	6	10	1058

4.2. Pesquisa de mutações no gene *kdr* e *ace-1* em *A. gambiae* s.l.

Da amostra total composta por 2117 indivíduos, foi efetuada a pesquisa de mutações nos genes *kdr* e *ace-1* em 1741 indivíduos. Destas, 1706 (98%) foram genotipadas com sucesso para o locus *kdr* e 1726 (99%) foram genotipadas com sucesso para o locus *ace-1*.

As frequências alélicas para estes dois *loci*, para cada uma das três regiões definidas e por espécie, estão apresentadas na figura 16. As tabelas A2 e A3 dos anexos detalham numericamente as frequências alélicas e genotípicas nos dois *loci*, por espécie, região e localidade.

Para os dois marcadores analisados, não foram detetados alelos mutantes associados à resistência em *A. melas*.

Relativamente às mutações *kdr*, a frequência do alelo 1014F, associado à resistência, foi superior em *A. gambiae*, ocorrendo numa frequência de 41% na amostra total. No entanto, a frequência deste alelo variou consoante a região. Enquanto na região litoral se detetou uma frequência de 0,8%, tendo sido observado em apenas 3 localidades, este alelo apresentou frequências superiores a 95% nas localidades do

interior. Nas localidades da região central, o alelo 1014F foi detetado com frequências intermédias, entre 9% e 75%.

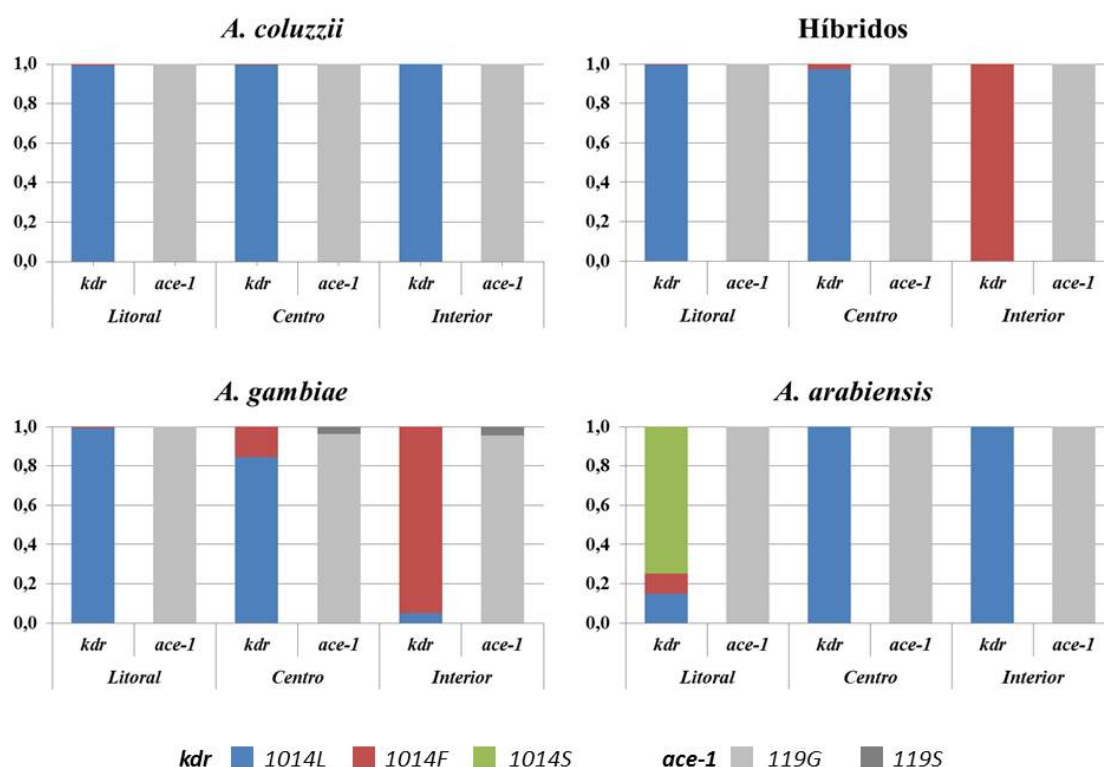


Figura 16 – Distribuição das frequências alélicas nos loci *kdr* e *ace-1* no complexo *A. gambiae*

Em *A. coluzzii*, o alelo 1014F, associado à resistência, foi detetado apenas em duas ocasiões, um exemplar em Prábis (Litoral) em heterozigotia, e outro exemplar em Gambaná (Centro) em homozigotia.

No grupo de indivíduos identificados como híbridos foi possível observar o alelo 1014F em todas as regiões (litoral: 0,2%; centro: 2,5%), apresentando-se fixo nos 5 indivíduos híbridos detetados nas localidades do interior.

Anopheles arabiensis foi o único a apresentar o alelo 1014S, cuja presença parece encontrar-se confinada às localidades da região litoral, apresentando-se em elevada frequência (78%) na amostra colhida em Antula. Foram ainda encontrados nesta localidade dois exemplares *A. arabiensis* cujo genótipo incluía ambos os alelos mutados, 1014S e o 1014F.

Em relação ao locus *ace-1*, foi detetado o alelo mutado 119S apenas em *A. gambiae* (Figura 16). A presença deste alelo verificou-se em todas as localidades do interior e apenas numa localidade da região central. As frequências deste alelo variaram

entre 2% na localidade de Comuda (Interior) e 11% em Mansabá (Centro). Todos os indivíduos portadores do alelo 119S eram heterozigóticos com o alelo suscetível (*i.e.* 119G/119S, Tabela A3 dos anexos).

4.3. Determinação da origem das refeições sanguíneas

Foram analisadas por ELISA 546 refeições sanguíneas para a presença de IgG de sangue humano, ave (galiforme), bovino, caprino/ovino e canino. Estas amostras foram obtidas de fêmeas capturadas em repouso em seis localidades; três na região litoral (Safim, Antula e Nhacra), uma na região centro (Mansoa) e duas na região interior (Leibala e Canjufa). Com exceção de Safim, onde foi possível obter 70 refeições sanguíneas de fêmeas capturadas em repouso no exterior, todas as restantes refeições foram provenientes de fêmeas capturadas no interior. A tabela A4 dos anexos detalha os resultados obtidos para esta análise.

Não foi possível determinar a origem da refeição para 9,8% das amostras analisadas, com os anticorpos testados. As refeições sanguíneas mistas constituíram 2% da amostra total, tendo-se observado sete refeições sanguíneas em Humano combinadas com sangue Bovino, Canino ou Caprino e cinco refeições sanguíneas provenientes de Bovino em combinação com Caprino ou Canino. Verificou-se ainda a presença de refeições mistas em todas as espécies, com a exceção de *A. arabiensis* (Tabela A4 dos anexos).

Apenas uma das refeições sanguíneas, positiva para IgG humana, pertencia a uma fêmea identificada como *A. arabiensis*, capturada na localidade de Leibala (região interior).

A tabela 3 apresenta os valores do índice de antropofilia (IA) para *A. coluzzii*, *A. gambiae* e híbridos, calculados por região e com base nas amostras obtidas nas colheitas de mosquitos em repouso no interior das habitações humanas.

Tabela 3 – Índices de antropofilia para *A. coluzzii*, *A. gambiae* e híbridos obtidos em colheitas em repouso no interior das habitações humanas

	<i>A. coluzzii</i>	híbridos	<i>A. gambiae</i>
Região Litoral	0,46 (13)	0,33 (97)	0,41 (142)
Região Central	0,82 (17)	0,71 (7)	0,78 (9)
Região Interior	1,00 (3)	1,00 (6)	0,99 (170)
Total	0,70 (33)	0,39 (110)	0,73 (321)

Legenda: os valores decimais correspondem ao índice de antropofilia e os valores em parêntesis ao número de amostras sanguíneas analisadas.

No total, verificou-se que o IA para *A. gambiae* e *A. coluzzii* não ultrapassou 0,73, sendo este valor perto de metade no caso dos exemplares classificados como híbridos. No entanto, o IA variou consoante as regiões amostradas. Para ambas as espécies (e híbridos), os valores mais baixos foram observados na região litoral que, com exceção da localidade de Nhacra (IA=0,90 em *A. gambiae*), não ultrapassaram 0,50 nas localidades amostradas (Tabela A4, anexos). Estes valores contrastam com os elevados IA obtidos na região interior, que variaram entre 0,92 e 1,00 nas localidades amostradas (Tabela A4, anexos). Na região central, representada apenas por uma localidade (Mansoa), observaram-se valores intermédios de IA, entre 0,71 (híbridos) e 0,82 (*A. coluzzii*) (Tabela 3).

Na região litoral, onde se verificaram os IA mais baixos, houve uma elevada frequência de refeições sanguíneas efetuadas em gado bovino. Este tipo de refeição sanguínea foi predominante em *A. melas* e em híbridos, e semelhante à frequência de refeições sanguíneas efetuadas em humanos por *A. coluzzii* e *A. gambiae* (Figura 17).

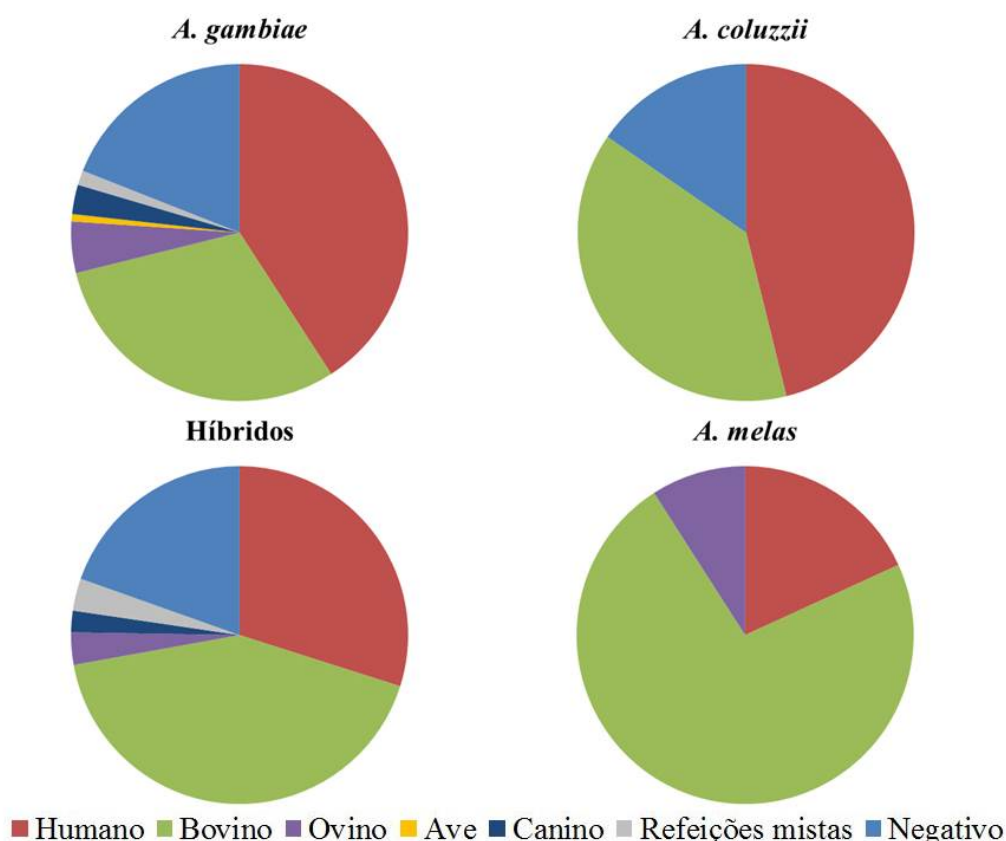


Figura 17. Origem da refeição sanguínea nas espécies amostradas em repouso no interior de habitações, na região litoral da Guiné-Bissau.

A localidade de Safim foi a única em que se pôde efetuar uma comparação entre amostras obtidas por colheitas de mosquitos em repouso no interior e no exterior de habitações humanas. Assim, a proporção de refeições sanguíneas identificada para cada tipo de sangue (*i.e.* incluindo refeições mistas), em fêmeas capturadas por estes dois tipos de colheita, encontra-se na tabela 4.

Relativamente às fêmeas colhidas no interior das habitações, verificou-se que a proporção de refeições sanguíneas em humanos (*i.e.* o IA) variou entre 0,18 em *A. melas* e 0,42 em *A. coluzzii*. As refeições sanguíneas provenientes de bovino apresentaram as maiores proporções em todas as espécies, variando entre 0,42 e 0,73 para *A. coluzzii/A. gambiae* e *A. melas* respetivamente. Foram ainda verificadas refeições sanguíneas provenientes de outros hospedeiros mamíferos e um caso de uma refeição efetuada em ave.

Tabela 4 - Proporção de refeições sanguíneas por tipo de sangue em fêmeas colhidas no interior (IR) e no exterior (OR) das habitações.

Tipo de Colheita	Espécie	N	Humano	Bovino	Caprino	Ave	Canino
IR	<i>A. coluzzii</i>	12	0,42	0,42	-	-	-
	híbridos	80	0,21	0,51	0,05	-	0,04
	<i>A. gambiae</i>	106	0,26	0,42	0,04	0,01	0,06
	<i>A. melas</i>	11	0,18	0,73	0,09	-	-
OR	<i>A. coluzzii</i>	3	-	1,00	-	-	-
	híbridos	21	0,05	0,90	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	35	-	1,00	0,03	-	-
	<i>A. melas</i>	11	-	1,00	-	-	-

Legenda: N: número de amostras sanguíneas analisadas.

Para as fêmeas colhidas no exterior e comparativamente às colhidas no interior, verificou-se uma predominância das refeições sanguíneas provenientes de bovinos, sendo exclusivas em todas as espécies com a exceção dos indivíduos identificados como híbridos, onde se detetou um caso de uma refeição simples proveniente de humano. Em *A. gambiae* verificou-se, numa ocasião, a ocorrência de uma refeição mista proveniente de bovino e caprino.

4.4. Detecção da proteína CSP do parasita *P. falciparum*

Foram analisados um total de 691 mosquitos por CSP-ELISA, provenientes de 8 das 12 localidades do transeto (Tabela 5).

Tabela 5 – Amostras analisadas por CSP-ELISA

		N	<i>A. arabiensis</i>	<i>A. coluzzii</i>	híbridos	<i>A. gambiae</i>	<i>A. melas</i>
Litoral	Prábis	100	0 (0)	0 (22)	0 (31)	0 (37)	0 (10)
	Safim	100	0 (1)	0 (11)	0 (36)	0 (45)	0 (7)
	Nhacra	135	0 (0)	0 (12)	0 (41)	0 (80)	0 (2)
Centro	Mansoa	100	0 (0)	0 (40)	0 (24)	0 (34)	0 (2)
	Gambaná	100	0 (0)	0 (95)	0 (4)	0 (1)	0 (0)
Interior	Comuda	67	0 (4)	1* (8)	0 (1)	1+1* (54)	0 (0)
	Leibala	75	0 (3)	0 (0)	0 (3)	5* (69)	0 (0)
	Canjufá	14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (14)	0 (0)

Legenda: N: número de indivíduos analisados em cada localidade. Os valores a negrito correspondem ao número de mosquitos positivos para CSP-ELISA. O asterisco indica os casos em que o valor de absorvância foi próximo do *cut-off*. Os valores em parêntesis referem-se ao total de indivíduos analisados.

Apenas numa ocasião se obteve um sinal distintamente positivo para a presença de CSP (Abs.=4,00; *cut-off*=0,09), nomeadamente, um exemplar *A. gambiae* proveniente de Comuda (Interior). Registaram-se ainda 7 resultados positivos, mas os valores de absorvância para estes indivíduos foram bastante próximos do *cut-off* (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de absorvância e *cut-off* para os resultados positivos por CSP-ELISA.

	Espécie	Abs_{405nm}	Cut-off
Comuda	<i>A. gambiae</i>	4,000	0,089
	<i>A. gambiae</i>	0,220	0,197
	<i>A. coluzzii</i>	0,204	0,197
Leibala	<i>A. gambiae</i>	0,092	0,082
	<i>A. gambiae</i>	0,086	0,082
	<i>A. gambiae</i>	0,084	0,082
	<i>A. gambiae</i>	0,086	0,082
	<i>A. gambiae</i>	0,083	0,082

Assim, foram detetados mosquitos positivos para proteína CSP apenas em localidades da região interior. Uma interpretação conservadora destes resultados sugere uma taxa esporozoítica de 1,5% em *A. gambiae* na localidade de Comuda. Assumindo que os restantes valores positivos também correspondem a mosquitos infetados com esporozoítos (*i.e.* infeções ligeiras), obtêm-se as seguintes taxas esporozoíticas: 1,5% em *A. coluzzii* e 3% em *A. gambiae*, para a localidade de Comuda; 6,7% em *A. gambiae* para Leibala.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste estudo, obteve-se uma descrição da distribuição das espécies pertencentes ao complexo *A. gambiae* ao longo de um transecto Este-Oeste na Guiné-Bissau, no final da época das chuvas. À semelhança do verificado em estudos anteriores (Petrarca *et al.*, 1983; Jaenson *et al.*, 1994; Fonseca *et al.*, 1996; Dabiré *et al.*, 2008; Marsden *et al.*, 2011; Nwakanma *et al.*, 2013), foram identificadas quatro espécies pertencentes ao complexo; *A. arabiensis*, *A. coluzzii*, *A. gambiae* e *A. melas*. A distribuição destas espécies apresentou, contudo, um padrão distinto, variando em três regiões distintas que coincidem com os biótopos principais encontrados no país.

Anopheles coluzzii e *A. gambiae* foram as espécies mais abundantes, ocorrendo em simpatria em todas as localidades amostradas. No entanto, pareceu haver uma alternância na frequência relativa destas espécies consoante o biótopo ocupado. *Anopheles gambiae* predominou na região litoral e interior, enquanto *A. coluzzii* predominou na região central do transecto. Estas espécies são frequentemente encontradas em simpatria em extensas regiões da África Ocidental, sendo interessante constatar que apresentam frequentemente abundâncias opostas, mesmo em situações onde as colheitas são efetuadas em localidades muito próximas (*i.e.* menos de 50 km entre localidades) (Gimonneau *et al.*, 2012; Kamdem *et al.*, 2012). A ocorrência deste fenómeno é atribuída à maior presença de criadouros larvares de carácter mais temporário *versus* criadouros mais associados à atividade humana como arrozais, mais associados com a espécie *A. coluzzii* (della Torre *et al.*, 2005; Diabaté *et al.*, 2008). Devido à maior capacidade para evitar predadores, as larvas de *A. coluzzii* encontram-se melhor adaptadas a criadouros antropogénicos, maiores e mais estáveis, geralmente associados com atividades agrícolas (Diabaté *et al.*, 2008). Assim, as diferenças encontradas na abundância relativa de *A. coluzzii* e *A. gambiae* na Guiné-Bissau podem estar associadas a diferenças na disponibilidade de criadouros permanentes *versus* temporários. Estudos adicionais caracterizando a bioecologia larvar destas espécies nas três regiões estudadas serão necessários para verificar esta hipótese.

Anopheles gambiae foi a espécie mais abundante na região litoral, onde também se verificou a maior frequência de indivíduos híbridos entre *A. coluzzii* e *A. gambiae*. Nesta região, tem-se verificado um aumento da frequência relativa de *A. gambiae* juntamente com elevados níveis de diversidade genética, sugerindo que esta espécie se encontra em expansão populacional (Gordicho *et al.*, 2014). Este resultado

pode refletir uma maior capacidade adaptativa de *A. gambiae* originada pela integração de variantes genéticas de *A. coluzzii* por introgressão genética assimétrica nesta região de contato secundária entre as duas espécies (Oliveira *et al.*, 2008; Marsden *et al.*, 2011).

Na África Ocidental *A. gambiae* é geralmente mais abundante em regiões mais húmidas, sendo *A. coluzzii* e *A. arabiensis* mais frequentes em regiões mais áridas, como a região interior da Guiné-Bissau (della Torre *et al.*, 2005; Diabaté *et al.*, 2008; Costantini *et al.*, 2009). No entanto, na região interior da Guiné-Bissau, mais árida, a espécie mais abundante foi *A. gambiae*. Tendo o estudo decorrido no final da época das chuvas, é possível que a abundância de criadouros larvares mais efêmeros, caraterísticos de *A. gambiae*, tenha elevado a abundância desta espécie relativamente a *A. coluzzii* e *A. arabiensis*. Assim, o desenvolvimento de novos estudos na região, que decorram na época seca, são importantes para se perceber se o domínio aparente de *A. gambiae* nesta região é uma situação estável ou se corresponde a uma oscilação sazonal. De fato, na região litoral a frequência de *A. coluzzii* foi superior à de *A. gambiae* numa amostra colhida na época seca, contrastando com as restantes colhidas na época das chuvas onde *A. gambiae* foi a espécie mais frequente (Gordicho *et al.*, 2014).

Devido à preferência por biótopos de caraterísticas muito específicas, como floresta de mangal e águas salobras, *A. melas* foi identificado apenas nas localidades da região litoral e em Mansoa, como verificado em estudos anteriores (Jaenson *et al.*, 1994; Palsson *et al.*, 2004; Dabiré *et al.*, 2008). A identificação de dois indivíduos na localidade de Mansoa (região central), pode dever-se à proximidade do local de colheita com o estuário do rio Mansoa. Foram também reportados exemplares de *A. melas* a uma distância de 150km para o interior, ao longo do rio Gâmbia (República da Gâmbia), onde águas salobras podem penetrar grandes distâncias para o interior (Caputo *et al.*, 2008). Apesar de pouco abundantes, estes mosquitos são eficientes vetores de malária, podendo em situações específicas, ser o único vetor de malária presente (Dabiré *et al.*, 2008; Deitz *et al.*, 2012).

Neste estudo, à semelhança do verificado anteriormente por Petrarca *et al.* (1983) confirmou-se a presença de *A. arabiensis* na região interior. A ocorrência de *A. arabiensis* nesta região reflete a preferência desta espécie por ambientes mais áridos (Coetzee *et al.*, 2000; Onyabe & Conn, 2001; Niang *et al.*, 2014). Esta espécie

foi também identificada em localidades na região centro, caracterizada pela presença de floresta tropical. A ocorrência de *A. arabiensis* em regiões de floresta é conhecida, particularmente em locais com uma história recente de perturbações ecológicas, como a desflorestação (Sinka *et al.*, 2010). Inesperadamente, na região litoral, em particular na localidade de Antula, verificou-se também a presença de *A. arabiensis*. Nesta localidade, decorrem levantamentos entomológicos desde 1993, com recurso aos mesmos métodos de colheita no interior de habitações aqui utilizados, não tendo sido reportada qualquer ocorrência desta espécie (Petrarca *et al.*, 1983; Fonseca *et al.*, 1996; Palsson *et al.*, 1998, 2004; Dabiré *et al.*, 2008). Nas colheitas entomológicas realizadas em Antula em 2010, Gordicho *et al.*, (2014) verificou que *A. arabiensis* era a espécie mais frequente (54%) nas colheitas larvares efetuadas, em contraste com os 4% de adultos identificados neste estudo, com recurso a armadilhas CDC no interior das habitações. Estes estudos sugerem a presença de uma população de *A. arabiensis* marcadamente exofágica, já que a utilização de armadilhas CDC colocadas no interior de habitações captura preferencialmente porções de uma população de mosquitos endofágica. Estas características estão de acordo com estudos bioecológicos, que descrevem *A. arabiensis* como possuindo uma maior plasticidade comportamental, quando comparado com *A. gambiae* e *A. coluzzii*, estando por vezes associado a uma maior propensão em se alimentar em hospedeiros não humanos (Sinka *et al.*, 2010). O estudo de Gordicho *et al.* (2014) sugere ainda que a população de *A. arabiensis* se encontra em expansão, tendo permanecido sem ser detetada em levantamentos entomológicos anteriores não só devido à sua baixa abundância, mas também aos métodos de colheita utilizados, direcionados para as frações endofágicas e endofílicas das populações de mosquitos vetores.

Em contraste com outras regiões na África Ocidental, onde a hibridação entre as espécies *A. gambiae* e *A. coluzzii* é baixa (*i.e.* <1%) (Tripet *et al.*, 2001; della Torre *et al.*, 2005; Costantini *et al.*, 2009), verificaram-se neste estudo elevadas taxas de hibridação ao longo do transeto efetuado. Estes resultados, juntamente com outros obtidos anteriormente na região (Oliveira *et al.*, 2008; Caputo *et al.*, 2011; Marsden *et al.*, 2011) e em regiões vizinhas (Caputo *et al.*, 2008; Nwakanma *et al.*, 2013) confirmam a ocorrência de uma zona de contato secundário entre *A. coluzzii* e *A. gambiae*, cujo núcleo de maior hibridação parece localizar-se na região litoral da Guiné-Bissau, onde a frequência de híbridos atingiu os 34%.

No que respeita à comparação entre os genótipos obtidos pelos marcadores IGS e SINE na identificação de *A. coluzzii* e *A. gambiae*, verificou-se uma concordância de 90% entre ambos os métodos. Apesar de todas as combinações possíveis entre marcadores terem sido verificadas, as principais discrepâncias entre marcadores, devem-se a indivíduos identificados como híbridos para o marcador IGS e como *A. gambiae* para o marcador SINE ou indivíduos identificados como *A. gambiae* ou *A. coluzzii* pelo marcador IGS e que apresentavam um padrão híbrido pelo marcador SINE. Caputo *et al.* (2011) sugere que estes indivíduos representem a geração *F_n* resultante de cruzamentos entre *A. gambiae* e *A. coluzzii* que ocorrem nesta zona de contato secundária, onde os mecanismos de isolamento reprodutivo parecem ser menos efetivos do que na restante distribuição simpátrica destas espécies. As discrepâncias observadas entre os marcadores IGS e SINE levaram Caputo *et al.* (2011) a levantar a hipótese de que se podem dever à presença, no mesmo indivíduo, de um número desigual de cópias de rADN com os polimorfismos específicos das duas espécies, sugerindo a ocorrência de um processo de recombinação na região centromérica do cromossoma X, onde estão localizados os dois marcadores. As diferenças observadas podem ser também resultado de limitações inerentes a técnica de IGS-PCR, nomeadamente, a diferença no número de cópias na região IGS pode resultar num padrão de bandas de intensidades distintas numa eletroforese em gel de agarose, podendo levar a uma interpretação errada dos resultados. Por outro lado a ocorrência de uma restrição enzimática incompleta pode também originar uma leitura incorreta dos resultados (Santolamazza *et al.*, 2011). No geral, os resultados obtidos confirmam as limitações técnicas na distinção entre *A. gambiae* e *A. coluzzii*, nomeadamente a ausência de complementaridade absoluta, podendo resultar numa estimação errada da abundância de híbridos. Isto é particularmente relevante em locais onde ocorra fluxo genético significativo entre espécies, como é o caso do extremo ocidental africano. Assim, a utilização de mais do que uma abordagem na identificação destas espécies é sugerida por Santolamazza *et al.* (2011), em regiões onde estas espécies ocorram em simpatria.

A distribuição de mutações *kdr* variou entre espécies e regiões amostradas tendo-se detetado apenas a mutação L1014F em *A. coluzzii*, *A. gambiae* e híbridos e ambas as mutações *kdr* (*i.e.* L1014F e L1014S) em *A. arabiensis*. A elevada frequência da mutação L1014F em *A. gambiae*, particularmente na região interior da

Guiné-Bissau é consistente com estudos anteriores na região ocidental Africana, onde esta mutação se encontra, em alguns casos, próxima da fixação (Santolamazza *et al.*, 2008b). No entanto, num estudo realizado na Guiné-Bissau por Dabiré *et al.* (2008) com amostras colhidas em 2002, verificou-se uma frequência reduzida da mutação L1014F em *A. gambiae*, sublinhando a rápida dinâmica de evolução de genótipos de resistência em curso nesta área da África Ocidental (Dabiré *et al.*, 2008; Namountougou *et al.*, 2012).

No transecto efetuado, a frequência da mutação L1014F em *A. gambiae* e híbridos apresentou um padrão distinto entre regiões, com muito maior frequência na região interior e baixas frequências nas regiões centro e litoral. Estes resultados sugerem a existência de diferentes pressões seletivas, potencialmente mais intensas na região interior, onde o uso de inseticidas piretróides é mais frequente na proteção de explorações agrícolas (Dabiré *et al.*, 2008). Na Guiné-Bissau, foram efetuados estudos de estrutura genética, com recurso a análise de ADN microssatélite, que sugerem a ocorrência em *A. gambiae* de duas subpopulações geneticamente diferenciadas, uma da região litoral e outra da região interior (Vicente *et al.*, 2013). Estes resultados apontam para a presença de uma barreira ao fluxo genético entre populações de *A. gambiae* da região litoral e interior, na região central onde predomina *A. coluzzii*. Estas observações podem também explicar a diferença verificada nas frequências de mutações *kdr* nesta espécie.

A frequência da mutação L1014F foi reduzida em *A. coluzzii* em todas as regiões amostradas, uma vez mais em linha com estudos anteriores (Diabaté *et al.*, 2002; Etang *et al.*, 2006; Dabiré *et al.*, 2008; Djogbénou *et al.*, 2008). De fato a ausência ou baixa frequência do alelo L1014F em populações simpátricas de *A. coluzzii* com *A. gambiae* onde este alelo apresentava elevada frequência foi considerada uma das maiores evidências à ocorrência de restrições ao fluxo genético entre *A. gambiae* e *A. coluzzii* (Santolamazza *et al.*, 2008b). Tem sido proposto que as diferenças observadas nas frequências de mutações *kdr* entre *A. gambiae* e *A. coluzzii* estarão relacionadas com a diferente origem da mutação nas duas populações ou devido às diferentes características bioecológicas e comportamentais entre espécies. Estudos iniciais na África Ocidental por Weill *et al.* (2000) sugeriram que, apesar da ocorrência em simpatria de *A. gambiae* e *A. coluzzii*, a mutação L1014F presumivelmente teve origem *A. gambiae*, tendo mais tarde sido adquirida por *A.*

coluzzii por introgressão genética e encontrando-se agora em dispersão nesta espécie. No entanto existem exceções, onde origens independentes desta mutação em *A. coluzzii* foram já observadas (Reimer *et al.*, 2005; Etang *et al.*, 2009).

Para além de se ter verificado a presença de *A. arabiensis* na região litoral e em particular em Antula, verificou-se que esta população, para além de apresentar a mutação L1014F foi a única a apresentar a mutação L1014S. A presença deste alelo em *A. arabiensis* na África Ocidental foi já reportado no Burkina Faso e no Benim (Badolo *et al.*, 2012; Dabiré *et al.*, 2014). Um evento mutacional independente terá originado a mutação L1014F em *A. arabiensis* (Diabaté *et al.*, 2004), no entanto a origem da mutação L1014S nesta espécie na África Ocidental é ainda desconhecida. No Burkina Faso, devido à proximidade com o Benim, onde a mutação L1014S foi inicialmente detetada em populações de *A. arabiensis*, é sugerido que possam ter sido importadas populações que apresentassem a mutação (Dabiré *et al.*, 2014).

Neste estudo foi efetuada pela primeira vez a pesquisa de mutações no gene *ace-1*, em populações de *A. gambiae* s.l. da Guiné-Bissau. Os resultados demonstram a presença do alelo associado à resistência apenas em *A. gambiae* na região centro e interior, com baixas frequências. De fato, em várias regiões da África Ocidental verificaram-se frequências mais elevadas da mutação G119S em *A. gambiae* do que em *A. coluzzii*. (Djogbénou *et al.*, 2008; Dabiré *et al.*, 2009). Djogbenou *et al.*, (2008) sugere que a mutação G119S terá ocorrido em *A. coluzzii* e posteriormente em *A. gambiae* por introgressão. No entanto e à semelhança do presente estudo, é comum uma maior frequência desta mutação em *A. gambiae*. De fato, Essandoh *et al.*, (2013), verificou uma interação entre genótipos e espécies, de modo que os indivíduos *A. gambiae* heterozigóticos são mais resistentes do que os indivíduos *A. coluzzii* heterozigóticos. Apesar do mecanismo não ser claro, poderá envolver a presença de outros mecanismos de resistência adicionais, ou diferenças na duplicação do alelo mutado entre ambas as espécies. Para além disso, estes resultados podem também refletir diferentes pressões seletivas a atuar nestas populações (Dabiré *et al.*, 2009).

A ausência de indivíduos homozigóticos para o alelo 119S neste estudo pode estar relacionada com os elevados custos de *fitness* que a mutação G119S implica (Weill *et al.*, 2004; Djogbénou *et al.*, 2008; Djogbénou *et al.*, 2010). Como consequência, numa área onde o alelo 119S se encontra presente, é maioritariamente

no estado heterozigótico. No entanto, e à semelhança do que foi já descrito em *Culex pipiens*, pode ocorrer a duplicação do alelo resistente, resultando num fenótipo heterozigótico que apresenta o mesmo nível de resistência mas com custos de *fitness* inferiores, quando comparado com o fenótipo homozigótico resistente. (Djogbénou *et al.*, 2008).

Neste estudo, verificaram-se diferentes níveis de antropofilia em *A. gambiae* e *A. coluzzii* entre as regiões amostradas na Guiné-Bissau. Os baixos valores de IA obtidos nas regiões litoral e central, não são consistentes com os observados noutras regiões da África Ocidental para *A. gambiae* e *A. coluzzii*, que geralmente são espécies marcadamente antropofílicas e pouco afetadas pela abundância de hospedeiros alternativos a humanos (Service, 1993; White, 2003). No entanto, à semelhança deste estudo, foram já reportados casos excecionais de baixos níveis de antropofilia para estas espécies (Dolo *et al.*, 2004; Caputo *et al.*, 2008; Lefèvre *et al.*, 2009), que parecem estar relacionados com a elevada utilização redes mosquiteiras em particular em zonas próximas de áreas de cultivo (*e.g.* arrozais) devido à elevada densidade de mosquitos (Dolo *et al.*, 2004; Lefèvre *et al.*, 2009), que podem ter influenciado os hábitos de picada em favor de outros animais domésticos, como gado bovino, frequente na área em estudo, particularmente no litoral. De fato, observou-se uma elevada utilização de redes mosquiteiras nas localidades amostradas (dados não apresentados), confirmando estudos anteriores que reportaram a elevada utilização de redes mosquiteiras na Guiné-Bissau, destacando-se a localidade de Antula, onde a utilização de redes mosquiteiras foi superior a 90% (Rodrigues *et al.*, 2008). As medidas de controlo vetorial baseadas na utilização de inseticidas para uso pessoal e/ou pulverizações com inseticidas residuais, podem também promover uma alteração nos padrões de alimentação como verificado por Molineaux & Gramiccia (1980).

Na localidade de Safim, foi possível obter uma comparação sobre a origem das refeições sanguíneas em fêmeas capturadas no interior e exterior das habitações. A presença de hospedeiros alternativos ao homem foi mais evidente nesta localidade, onde a maioria das habitações prospetadas formavam, no seu conjunto, um cercado para gado bovino. Este fator, juntamente com a utilização de redes mosquiteiras, terá contribuído para a elevada proporção de refeições sanguíneas identificadas como sangue de gado bovino. Esta tendência foi independente da espécie, tendo as

refeições sanguíneas provenientes de bovinos variado entre 42% e 73% em amostras colhidas no interior da habitação, e entre 90% e 100% em amostras colhidas no exterior das habitações.

A presença da proteína CSP foi detetada apenas em mosquitos provenientes de localidades da região interior. No entanto, apenas por uma ocasião o valor de absorvância foi claramente positivo, sendo nos restantes casos muito perto dos valores de *cut-off*. A técnica de ELISA-CSP pode ser menos sensível do que outras (*e.g.* disseção de glândulas salivares, PCR), em particular quando se encontram presentes baixos números de esporozoítos (Durnez *et al.*, 2011). Assim e mesmo considerando como positivos os resultados com valor de absorvância perto do *cut-off*, assumindo que se trata de infeções esporozoíticas de baixa intensidade, as taxas esporozoíticas obtidas para a Guiné-Bissau neste estudo (1,5%-6,7%) foram baixas quando comparadas com estudos anteriores, nomeadamente na região litoral da Guiné-Bissau onde se verificou uma taxa esporozoítica de 9,6% (Jaensson *et al.*, 1994). Numa revisão efetuada por Hay *et al.* (2000) reunindo dados de 15 países africanos, verificou-se que a taxa esporozoítica média era de 3,35%, apresentando um mínimo de 0,01% (Ufuoni, Quénia) e um máximo de 20,3% (Yaoundé, Camarões). No entanto, as taxas esporozoíticas apresentam grandes variações regionais e sazonais, refletindo aspetos como a dinâmica das populações de vetores, o grau de antropofilia (e os fatores que o afetam), características climáticas e ambientais e medidas de controlo (Service, 1993; Hay *et al.*, 2000).

Conclusões

Este estudo permitiu a realização de uma descrição atualizada da distribuição das espécies do complexo *A. gambiae* num transeto Este-Oeste no final da época das chuvas na Guiné-Bissau. Dos resultados obtidos, destaque para a elevada frequência de híbridos na região litoral, bem como a inesperada presença de *A. arabiensis* na localidade de Antula (Litoral). Estes resultados são importantes em termos da implementação de programas de controlo vetorial, uma vez que o comportamento mais exofágico e exofílico de *A. arabiensis*, bem como a presença de genes associados à resistência a inseticidas nesta espécie, podem influenciar o sucesso de medidas baseadas no uso de inseticidas no interior das habitações. Por outro lado a ocorrência de uma zona de contato secundário entre *A. coluzzii* e *A. gambiae* pode

determinar a evolução e dispersão de genes de interesse como os de resistência a inseticidas.

Este estudo demonstrou também a variabilidade inter e intra-espécie na frequência de genes *kdr* e *ace-1* associados à resistência a inseticidas, com destaque para as diferenças verificadas em *A. gambiae* e *A. arabiensis* nas regiões do litoral e interior, sublinhando o importante papel destes estudos no apoio ao desenvolvimento de programas eficazes de controlo vetorial. Os parâmetros entomológicos relativos às preferências hemáticas (IA) e à prevalência de infeção nos mosquitos (taxa esporozóitica) foram também calculados, sugerindo a presença de populações de mosquitos capazes de adaptarem o seu comportamento às condições ambientais existentes, nomeadamente a procura por hospedeiros alternativos, com consequências nos padrões de transmissão de malária. Finalmente, os dados obtidos neste trabalho servem como base importante para futuros trabalhos, na Guiné-Bissau, nos quais seria interessante perceber se a distribuição, a diversidade e a abundância das espécies do complexo *A. gambiae* e dos genes associados à resistência aos inseticidas refletem uma situação estável ou se ocorre uma oscilação sazonal, com consequências na transmissão de malária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antinori S., Galimberti L., Milazzo L. & Corbellino M., 2012. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1), e2012013.
- Arez A.P., Pinto J., Pålsson K., Snounou G., Jaenson T.G.T. & Rosário V.E., 2003. Transmission of mixed *Plasmodium* species and *Plasmodium falciparum* genotypes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68:161–168.
- Awolola T.S., Oduola O.A., Strode C., Koekemoer L.L., Brooke B. & Ranson H., 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103:1139–1145.
- Ayala F.J., Escalante A.A., Lal A.A. & Rich S.M., 1998. Evolutionary relationships of human malaria parasites. In: *Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection*. Sherman, I.W. (Ed.), 5th Edition. *American Society for Microbiology Press*, Washington, pp. 285–300.
- Badolo A., Traore A., Jones C.M., Sanou A., Flood L., Guelbeogo W.M., Ranson H. & Sagnon N., 2012. Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: resistance on the rise? *Malaria Journal*, 11(232).
- Beales P.F. & Gilles H.M., 2002. Rationale and technique of malaria control. In: *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. Gilles H.M. & Warrell D.A. (Eds.), 4th Ed. Edward Arnold, Kent, pp. 108–190.
- Biai I.A.R.F., 2009. Efeitos das alterações climáticas na zona costeira noroeste da Guiné-Bissau. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Universidade Técnica de Lisboa, pp. 80
- Blandin S., Shiao S.H., Moita L.F., Janse C.J., Waters A.P., Kafatos F.C. & Levashina E.A., 2004. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*, 116:661–670.

- Braverman Y., 1994. Nematocera (Ceratopogonidae, Psychodidae, Simuliidae and Culicidae) and control methods. *Revue Scientifique et Technique de L'office International des Epizooties*, 13:1175–1199.
- Brunhes J., Le Goff G. & Geoffroy B., 1997. *Anophèles* afro-tropicaux. Description d'espèces nouvelles et changement de statuts taxonomiques (Diptera: Culicidae). *Annales de la Société entomologique de France*, 33:173–183.
- Burkot T.R., Zavala F., Gwadz R.W., Collins F.H., Nussenzweig R.S. & Roberts D.R. 1984. Identification of malaria-infected mosquitoes by a two-site Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33:227–231.
- Caputo B., Nwakanma D., Jawara M., Adiamoh M., Dia I., Konate L., Petrarca V., Conway D.J. & della Torre A., 2008. *Anopheles gambiae* complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae* s.s.. *Malaria Journal*, 7(182).
- Caputo B., Santolamazza F., Vicente J.L., Nwakanma D.C., Jawara M., Palsson K., Jaenson T., White B.J., Mancini E., Petrarca V., Conway D.J., Besansky N.J., Pinto, J. & della Torre A., 2011. The “far-west” of *Anopheles gambiae* molecular forms. *PLoS ONE*, 6(2), e16415.
- Chiodini P.L., Moody A.H. & Manser D.W., 2001. Malaria parasites. In: *Atlas of Medical Helminthology and Protozoology*. 4th Edition. Churchill Livingstone, London, pp. 61–69.
- Clarkson C.S., Weetman D., Essandoh J., Yawson A. E., Maslen G., Manske M., Field S.G., Webster M., Antão T., MacInnis B., Kwiatkowski D. & Donnelly M.J., 2014. Adaptive introgression between *Anopheles* sibling species eliminates a major genomic island but not reproductive isolation. *Nature Communications*, 5(4248).
- Coetzee M., Craig M. & Le Sueur D., 2000. Distribution of african malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today*, 16:74–77.
- Coetzee M., Hunt R.H., Wilkerson R., della Torre A., Coulibaly M.B. & Besansky N.B., 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619:246–274.

- Collins, F.H., Mehaffey, P.C., Rasmussen, M.O., Brandling-Bennett, A.D., Odera, J.S. & Finnerty V., 1988. Comparison of DNA-Probe and isoenzyme methods for differentiating *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical of Entomology*, 25:116-120.
- Coluzzi M., 1982. Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in Anopheline mosquitoes. In: *Mechanisms of speciation*. Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 143–153.
- Coluzzi M., Petrarca V. & di Deco M.A., 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bolletino di zoologia*, 52:45–63.
- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V. & Di Deco M.A., 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73:483–497.
- Corbel V. & N’Guessan R., 2013. Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: A pragmatic review In: *Anopheles mosquitoes – New insights into malaria vectors*, Sylvie Manguin (Ed.). InTech, Rijeka, Croatia, pp. 579–633.
- Costantini C., Ayala D., Guelbeogo W.M., Pombi M, Some C.Y., Bassole I.H.N., Ose K., Fotsing J-M, Sagnon N., Fontenille D., Besansky N.J. & Simard F., 2009. Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecology*, 9(16).
- Dabiré K.R., Diabaté A., Agostinho F., Alves F., Manga L., Faye O. & Baldet T., 2008. Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (kdr) in Guinea-Bissau, West Africa. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 101:119–123.
- Dabiré K.R., Diabaté A., Namontougou M., Djogbénou L., Kengne P., Simard F, Bass C. & Baldet T., 2009. Distribution of insensitive acetylcholinesterase (*ace-1^R*) in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Burkina Faso (West Africa). *Tropical Medicine and International Health*, 14:396–403.
- Dabiré K.R., Sawadodgo S., Diabate A., Toe K.H., Kengne P., Ouari A., Costantini C., Gouagna C., Simard F., Baldet T., Lehmann T. & Gibson G., 2013.

- Assortative mating in mixed swarms of the mosquito *Anopheles gambiae* s.s. M and S molecular forms, in Burkina Faso, West Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 27:298–312.
- Dabiré R.K., Namountougou M., Diabaté A., Soma D.D., Bado J., Toé H.K., Bass C. & Combarry P., 2014. Distribution and frequency of *kdr* mutations within *Anopheles gambiae* s.l. populations and first report of the *Ace.1G119S* mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). *PLoS ONE*, 9(7), e101484.
- de Zulueta J., 1987. Changes in the geographical distribution of malaria throughout history. *Parassitologia*, 29:193–205.
- Deitz K.C., Athrey G., Reddy M.R., Overgaard H.J., Matias A., Jawara M., della Torre A., Petrarca V., Pinto J., Kiszewski A., Kengne P., Costantini C., Caccone A., & Slotman M.A., 2012. Genetic isolation within the malaria mosquito *Anopheles melas*. *Molecular Ecology*, 21:4498–4513.
- della Torre A., Costantini C., Besansky N.J., Caccone A., Petrarca V., Powell J.R. & Coluzzi M., 2002. Speciation within *Anopheles gambiae* – the glass is half full. *Science*, 298:115–117.
- della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-yovo J., Favia G., Petrarca V. & Coluzzi M., 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Molecular Biology*, 10:9–18.
- della Torre A., Tu Z. & Petrarca V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35:755–769.
- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K.R., Simard F., Ouedraogo J.B., Guillet P. & Hougard J.M., 2004. First report of a *kdr* mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso, West Africa. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20:195–196.
- Diabaté A., Baldet T., Brengues C., Kengne P., Dabiré K.R., Simard F., Chandre F., Hougard J.M., Hemingway J., Ouedraogo J.B. & Fontenille D., 2003. Natural swarming behaviour of the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97:713–716.

- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Akogbeto M., Guiguemde T.R., Darriet F., Brengues C., Guillet P., Hemingway J., Small G.J. & Hougard J.M., 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67:617–622.
- Diabaté A., Dabire R.K., Heidenberger K., Crawford J., Lamp W.O., Culler L.E. & Lehmann T., 2008. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC Evolutionary Biology*, 8(5).
- Diatta M., Spiegel A., Lochouart L., & Fontenille D., 1998. Similar feeding preferences of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis* in Senegal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92:270–272.
- Djègbè I., Boussari O., Sidick A., Martin T., Ranson H., Chandre F., Akogbéto M. & Corbel V., 2011. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of *L1014S* kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malaria Journal*, 10(261).
- Djénontin A., Chandre F., Dabiré K.R., Chabi J., N'Guessan R., Baldet T., Akogbéto M. & Corbel V., 2010. Indoor use of plastic sheeting impregnated with carbamate combined with long-lasting insecticidal mosquito nets for the control of pyrethroid-resistant malaria vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83:266–270.
- Djogbénou L., Chandre F., Berthomieu A., Dabiré R., Koffi A., Alout H. & Weill M., 2008. Evidence of introgression of the *ace-1^R* mutation and of the *ace-1* duplication in West African *Anopheles gambiae* s.s. *PLoS One*, 3(5), e2172.
- Djogbénou L., Noel V. & Agnew P., 2010. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malaria Journal*, 9(12).
- Dolo G., Briët O.J.T., Dao A., Traoré S.F., Bouaré M., Sogoba M., Niaré O., Bagayogo M., Sangaré D., Teuscher T. & Touré Y.T., 2004. Malaria transmission in relation to rice cultivation in the irrigated Sahel of Mali. *Acta Tropica*, 89:147–159.
- Duchemin J.B., Tsy J.M., Rabarison P., Roux J., Coluzzi M. & Costantini C., 2001. Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* in Madagascar

- demonstrated by odour-baited entry traps. *Medical and Veterinary Entomology*, 15:50–57.
- Durnez L., Bortel W.V., Denis L., Roelants P., Veracx A., Trung H.D., Sochantha T. & Coosemans M., 2011. False positive circumsporozoite protein ELISA: a challenge for the estimation of the entomological inoculation rate of malaria and for vector incrimination. *Malaria Journal*, 10(195).
- Edi C.V., Djogbénou L., Jenkins A.M., Regna K., Muskavitch M.A.T., Poupardin R., Jones C.M., Essandoh J., Kétoh G.K., Paine M.J.I., Koudou B. G., Donnelly M.J., Ranson H. & Weetman D., 2014. CYP6 P450 enzymes and *ACE-1* duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004236.
- Elliot M., 1989. The pyrethroids: early discovery, recent advantages and the future. *Pesticide Science*, 27:337–351.
- Essandoh J., Yawson A. E. & Weetman D., 2013. Acetylcholinesterase (*Ace-1*) target site mutation 119S is strongly diagnostic of carbamate and organophosphate resistance in *Anopheles gambiae s.s.* and *Anopheles coluzzii* across southern Ghana. *Malaria Journal*, 12(404).
- Etang J., Fondjo E., Chandre F., Morlais I., Brengues C., Nwane P., Chouaibou M., Ndjemai H. & Simard F., 2006. First report of knockdown resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74:795–797.
- Etang J., Vicente J.L., Nwane P., Chouaibou M., Morlais, I., Do Rosario V.E., Simard F., Awono-Ambene P., Toto J.C. & Pinto, J., 2009. Polymorphism of intron-1 in the voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae s.s.* populations from Cameroon with emphasis on insecticide knockdown resistance mutations. *Molecular Ecology*, 18:3076–3086.
- Fanello C., Santolamazza F. & della Torre A., 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology*, 16:461–464.
- FAO, 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations GEONETWORK. Land cover of Guinea-Bissau - Globcover Regional (GeoLayer). Acedido a: 24 de Março 2014. URI: <http://data.fao.org/ref/2b910fa6-190b-4d72-a909-d07638111bbc.html?version=1.0>

- Favia G., della Torre A., Bagayoko M., Lanfrancotti A., Sagnon N'F., Touré Y.T. & Coluzzi M., 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence for their reproductive isolation. *Insect Molecular Biology*, 6:377–383.
- Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Sidén-Kiamos I. & Louis C., 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA (rDNA) polymorphisms discriminating chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 10: 19–23.
- Fettene M., Koekemoer L.L., Hunt R.H. & Coetzee M., 2002. PCR assay for identification of *Anopheles quadriannulatus* species B from Ethiopia and other sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, 16:214–217.
- Fonseca L.F., di Deco M.A., Carrara G.C., Dabo I., do Rosário V. & Petrarca V., 1996. *Anopheles gambiae* complex (Diptera:Culicidae) near Bissau City, Guinea Bissau, West Africa. *Journal of Medical Entomology*, 33:939–945.
- Fournier D., 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chemico-Biological Interactions*, 157–158: 257–261.
- Garrett-Jones C., 1964a. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bulletin of the World Health Organization*, 30: 241–261.
- Garrett-Jones C., 1964b. Prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity. *Nature*, 204: 1173–1175.
- Gentile G., Slotman M., Ketmaier V., Powell J.R., Caccone A., 2001. Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 10: 25–32.
- Gillies M.T. & De Meillon B., 1968. *The Anophelinae of Africa South of the Sahara*. The South African Institute for Medical Research N° 54, Johannesburg, pp. 343.
- Gimonneau G., Pombi M., Choisy M., Morand S., Dabiré R.K. & Simard F., 2012. Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 26:9–17.

- Gonçalves A., Ferrinho P. & Dias F., 1996. The Epidemiology of Malaria in Prábis, Guinea-Bissau. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:11–17.
- Gordicho V., Vicente J.L., Sousa C.A., Caputo B., Pombi M., Dinis J., Seixas G., Palsson K., Weetman D., Rodrigues A., della Torre A. & Pinto J., 2014. First report of an exophilic *Anopheles arabiensis* population in Bissau city, Guinea-Bissau: recent introduction or sampling bias? *Malaria Journal*, 13(423).
- Harbach R.E., 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*, 94:537–553.
- Hassan M.M., Zain H.M., Basheer M.A., Elhaj H-E.F. & El-Sayed B.B., 2014. Swarming and mating behavior of male *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae) in an area of the Sterile Insect Technique Project in Dongola, northern Sudan. *Acta Tropica*, 132S:S64–S69.
- Hawkes N.J. & Hemingway J., 2002. Analysis of the promoters for the beta-esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochimica Biophysica Acta*, 1574:51–62.
- Hay S.I., Rogers D.J., Toomer J.F. & Snow R.W., 2000. Annual *Plasmodium falciparum* entomological inoculation rates (EIR) across Africa. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene*, 94:113–127.
- Hemingway J. & Ranson H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45:371–391.
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L. & Ranson H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34:653–665.
- Hill S.M. & Crampton J.M., 1994. DNA-based methods for the identification of insect vectors. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88:227–250.
- Howard A.F.V., N’Guessan R., Koenraadt C.J.M., Asidi A., Farenhorst M., Akogbéto M., Knols B.G.J. & Takken W., 2011. First report of the infection of insecticide-resistant malaria vector mosquitoes with an entomopathogenic fungus under field conditions. *Malaria Journal*, 10(24).
- Huchard E., Martinez M., Alout H., Douzery E.J.P., Lutfalla G., Berthomieu A., Berticat C., Raymond M. & Weill M., 2006. Acetylcholinesterase genes

- within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 273:2595–2604.
- Hunt R.H., Coetzee M., & Fettene M., 1998. The *Anopheles gambiae* complex: a new specie from Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92:231–235.
- INEC – Instituto Nacional de Estatística e Censos (2011): <http://www.stat-guineebissau.com/index.htm> [acedido a 15 de Setembro de 2014].
- Jaenson T.G.T., Gomes M.J., Santos R.C.B., Petrarca V., Fortini D., Evora J. & Crato J., 1994. Control of endophagic *Anopheles* mosquitoes and human malaria in Guinea Bissau, West Africa by permethrin-treated bed nets. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88:620–624.
- Janeira F., Vicente J. L., Kanganje Y., Moreno M., do Rosário V. E., Cravo P., & Pinto J., 2008. A Primer-Introduced Restriction Analysis-Polymerase Chain Reaction method to detect knockdown resistance mutations in *Anopheles gambiae*. *Journal of Medical Entomology*, 45:237–241.
- Jones C.M., Liyanapathirana M., Agossa F.R., Weetman D., Ranson H., Donnelly M.J., & Wilding C.S., 2012a. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109:6614–6619.
- Jones C.M., Toé H.K., Sanou A., Namountougou M., Hughes A., Diabaté A., Dabiré R., Simard F. & Ranson H., 2012b. Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS ONE*, 7(9), e45995.
- Kager P.A., 2002. Malaria control: constraints and opportunities. *Tropical Medicine and International Health*, 7:1042–1046.
- Kamdem C., Fossog B.T., Simard F., Etouna J., Ndo C., Kengne P., Boussès P., Etoa F-X., Awono-Ambene P., Fontenille D., Antonio-Nkondjio C., Besansky N.J. & Costantini C., 2012. Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE*, 7(6), e39453.

- Ke X., Collins A. & Ye S., 2001. PIRA PCR designer for restriction analysis of single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics*, 17:838–839.
- Kim Y. H. & Lee S.H., 2013. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43:47–53.
- Kirkwood B.R., 1988. *The Essentials of Medical Statistics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 234.
- Knell A.J., 1991. *Malaria*. The Wellcome Trust, Oxford University, pp. 89.
- Kottek M., Grieser J., Beck C., Rudolf B. & Rubel F., 2006. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*, 15:259–263.
- Krzywinski J. & Besansky N.J., 2003. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Annual Review of Entomology*, 48:111–139.
- Kulkarni M.A., Rowland M., Alifrangis M., Mosha F.W., Matowo J., Malima, R., Peter J., Kweka E., Lyimo I., Magesa S., Salanti A., Rau M.E. & Drakeley, C., 2006. Occurrence of the leucine-to-phenylalanine knockdown resistance (*kdr*) mutation in *Anopheles arabiensis* populations in Tanzania, detected by a simplified high-throughput SSOP-ELISA method. *Malaria Journal*, 5(56).
- Lanzaro G.C. & Lee Y., 2013. Speciation in *Anopheles gambiae* – The distribution of genetic polymorphism and patterns of reproductive isolation among natural populations In: *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Sylvie Manguin (Ed.). InTech, Rijeka, Croatia, pp. 173-196.
- Lefèvre T. Gouagna L-C., Dabiré K.R., Elguero E., Fontenille D., Renaud F., Costantini C. & Thomas F., 2009. Beyond nature and nurture: phenotypic plasticity in blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae* s.s. when humans are not readily accessible. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81:1023–1029.
- Lowry R., 1998. VassarStat: Website for statistical computation. Disponível em: <http://vassarstats.net/>
- Marsden C.D., Lee Y., Nieman C.C., Sanford M.R., Dinis J., Martins C., Rodrigues A., Cornel A.J. & Lanzaro G.C., 2011. Asymmetric introgression between the M and S forms of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, maintains

- divergence despite extensive hybridization. *Molecular Ecology*, 20:4983–4994.
- Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Berge J.B., Devonshire A.L., Guillet P., Pasteur N. & Pauron D., 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.. *Insect Molecular Biology*, 7:179–184.
- Molineaux L. & Gramiccia G., 1980. The Garki Project. Research on the epidemiology and control of malaria in the Sudan savanna of West Africa. World Health Organization, Geneva, pp. 311.
- Moreno M., Vicente J.L., Cano, J., Berzosa P.J., de Lucio A., Nzambo S., Bobuakasi L., Buatiche J.N., Ondo M., Micha F., do Rosario V.E., Pinto J. & Benito A., 2008. Knockdown resistance mutations (*kdr*) and insecticide susceptibility to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* from Equatorial Guinea. *Tropical Medicine and International Health*, 13:430–433.
- Mukabayire O., Caridi J., Wang X., Touré Y.T., Coluzzi M. & Besansky N.J., 2001. Patterns of sequence variation in chromosomally recognised taxa of *Anopheles gambiae*: evidence from rDNA and single copy loci. *Insect Molecular Biology* 10:33–46.
- Nájera J.A., González-Silva M. & Alonso P.L., 2011. Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). *PLoS Medicine*, 8(1), e1000412.
- Namountougou M., Simard F., Baldet T., Diabaté A., Ouédraogo J.B., Thibaud Martin T. & Dabiré R.K., 2012. Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Burkina Faso, West Africa. *PLoS ONE*, 7(11), e48412.
- Niang E.H.A., Konaté L., Diallo M., Faye O. & Dia I., 2014. Reproductive isolation among sympatric molecular forms of *An. gambiae* from inland areas of south-eastern Senegal. *PLoS ONE*, 9(8), e104622.
- Nolan T., Papathanos P., Windbichler N., Magnusson K., Benton J., Catteruccia F. & Crisanti A., 2011. Developing transgenic *Anopheles* mosquitoes for the sterile insect technique. *Genetica*, 139:33–39.
- Nwakanma D.C., Neafsey D.E., Jawara M., Adiamoh M., Lund E., Rodrigues A., Loua K.M., Konate L., Sy N., Dia I., Awolola T.S., Muskavitch M.A.T. &

- Conway D.J., 2013. Breakdown in the process of incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Genetics*, 193:1221-1231.
- Okwa O.O., 2012. Introduction and Biology of Malaria. In: *Malaria Parasites*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 1-37.
- Oliveira E., Salgueiro P., Palsson K., Vicente J.L., Arez A.P., Jaenson T.G., Caccone A. & Pinto J., 2008. High levels of hybridization between molecular forms of *Anopheles gambiae* from Guinea Bissau. *Journal of Medical Entomology*, 45:1057–1063.
- Onyabe D.Y. & Conn J.E., 2001. The distribution of two major malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*, in Nigeria. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96:1081–1084.
- Palsson K., Jaenson T.G.T., Dias F., Laugen A.T. & Bjorkman A., 2004. Endophilic *Anopheles* mosquitoes in Guinea Bissau, West Africa, in relation to human housing conditions. *Journal of Medical Entomology*, 41:746–752.
- Palsson K., Pinto J., Rosario V.E. & Jaenson T.G.T., 1998. The palpal ratio method compared with PCR to distinguish between *Anopheles gambiae* s.s. and *A. melas* from Guinea Bissau, West Africa. *Acta Tropica*, 70:101–107.
- Pates, H. & Curtis C., 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annual Review of Entomology*, 50:53–70.
- Petrarca V., Carrara G.C., di Deco M.A. & Petrangeli G., 1983. Il complesso *Anopheles gambiae* in Guinea Bissau. *Parassitologia*, 25:29-39.
- Pinto J., Lynd A., Elissa N., Donnelly M.J., Costa C., Gentile G., Caccone A. & Rosário V.E., 2006. Co-occurrence of East and West African kdr mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Medical and Veterinary Entomology*, 20:27-32.
- Pinto J., Lynd A., Vicente J.L., Santolamazza F., Randle N.P., Gentile G., Moreno M., Simard F., Charlwood J.D., Rosário V.E., Caccone A., della Torre A. & Donnelly M.J., 2007. Multiple origins of knockdown resistance mutations in the afrotropical mosquito vector *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE*, 2(11), e1243.

- Pope C.N., 2010. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2:161–181.
- Ranson H., N'Guessan R., Lines J., Moiroux N., Nkuni Z. & Corbel V., 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*, 27:91–98.
- Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J. & Collins F.H., 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*, 9:491–497.
- Reimer L.J., Tripet F., Slotman M.A., Spielman A., Fondjo E. & Lanzaro G.C., 2005. An unusual distribution of the *kdr* gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Insect Molecular Biology*, 14:683–688.
- Rejmánková E., Grieco J., Achee N. & Roberts D.R. 2013. Ecology of Larval Habitats In: *Anopheles mosquitoes – New insights into malaria vectors*, Sylvie Manguin (Ed.). InTech, Rijeka, Croatia, pp. 397–446.
- Richards O.W. & Davies R.G., 1977. *Imm's general book of entomology II: General classification and biology*. Chapman and Hall, New York, pp. 1354.
- Rodrigues A., Schellenberg J.A., Kofoed P-E., Aaby P. & Greenwood B., 2008. Changing pattern of malaria in Bissau, Guinea Bissau. *Tropical Medicine and International Health*, 13:410–417.
- Santolamazza F., Mancini E., Simard F., Qi Y., Tu Z. & della Torre A., 2008a. Insertion polymorphism of *SINE200* retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malaria Journal*, 7(163).
- Santolamazza F., Calzetta M., Etang J., Barrese E., Dia I., Caccone A., Donnelly M.J., Petrarca V., Simard F., Pinto J. & della Torre A., 2008b. Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malaria Journal*, 7(74).
- Santolamazza F., Caputo B., Calzetta M., Vicente J.L., Mancini E., Petrarca V., Pinto J. & della Torre A., 2011. Comparative analyses reveal discrepancies among results of commonly used methods for *Anopheles gambiae* molecular form identification. *Malaria Journal*, 10(215).

- Scholte E-J., Ng'habi K., Kihonda J., Takken W., Paaijmans K., Abdulla S., Killeen G.F. & Knols B.G.J., 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult african malaria mosquitoes. *Science*, 308:1641–1642.
- Scott J.A., Brogdon W.G. & Collins F.H., 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49:520–529.
- Service M.W. & Townson H., 2002. The *Anopheles* vector. In: *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. Warrell D.A. & Gilles H.M. (Eds.), 4th Ed. Edward Arnold, Kent: 59–84.
- Service M.W., 1993. Mosquitos (Culicidae). In: *Medical insects and arachnids*. Lane, R.P. & Crosskey, R.W. (Eds.). Chapman and Hall, London, pp. 120–240.
- Simões M.J., Próspero M.I. & Ribeiro H. 1995. Optimização da técnica ELISA "two sites" utilizada na identificação de refeições sanguíneas de mosquitos. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 18:225–229.
- Sinka M.E., Bangs M.J., Manquin S., Coetzee M., Hemingway J., Patil A.P., Temperley W.H., Gething P.W., Kabaria C.W., Okara R.M., Van Boeckel T., Godfray H.C., Harbach R.E & Hay S.I., 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites and Vectors*, 3(117).
- Sinka M.E., Bangs M.J., Manquin S., Rubio-Palis Y., Coetzee M., Chareonviriyaphap T., Mbogo C.M., Hemingway J., Patil A.P., Temperley W.H., Gething P.W., Kabaria C.W., Burkot T.R., Harbach R.E & Hay S.I., 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and Vectors*, 5(69).
- Snow R.W. & Gilles H.M., 2002. *The epidemiology of malaria*, Warrell D.A. & Gilles H.M. (Eds.), 4rd Ed. Edward Arnold, Kent, pp. 85–106.
- Soderlund D.M. & Knipple D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33:563–577.
- Sokal R.R. & Rohlf F.J., 1981. *Biometry*. 2nd Ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, pp. 859.

- Sousa C.A., Pinto J., Almeida P.A., Ferreira C., do Rosário V.E. & Charlwood J.D., 2001. Dogs as a favored host choice of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae) of São Tomé West Africa. *Journal of Medical Entomology*, 38:122–125.
- Su X., Hayton K. & Wellems T.E., 2007. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nature Reviews Genetics*, 8:497–506.
- Sudia W.D. & Chamberlain R.W., 1988. Battery-operated light trap, an improved model. By Sudia W. D. & Chamberlain R. W., 1962. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 4:536–538.
- Thomas D.D., Donnelly C.A., Wood R.J. & Alphey L., 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287:2474–2476.
- Townson H. & Onapa A.W., 1994. Identification by rDNA-PCR of *Anopheles bwambae*, a geothermal spring species of the *An. gambiae* complex. *Insect Molecular Biology*, 3:279–282.
- Tripet F., Touré Y.T., Taylor C.E., Norris D.E., Dolo G. & Lanzaro G.C., 2001. DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology*, 10:1725–1732.
- Turusov V., Rakitsky V. & Tomatis L., 2002. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks. *Environmental Health Perspectives*, 110:125–128.
- Ursing J., Rombo L., Rodrigues A., Aaby P. & Kofoed P-E, 2014. Malaria transmission in Bissau, Guinea-Bissau between 1995 and 2012: Malaria resurgence did not negatively affect mortality. *PLoS ONE*, 9(7), e101167.
- van den Berg H., Zaim M., Yadav R.S., Soares A., Ameshewa B., Mnzava A., Hii J., Dash A.P. & Ejov M., 2012. Global Trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. *Environmental Health Perspectives*, 120:577–582.
- Vicente J.L., Weetman D., Caputo B., Pombo M., Sousa C.A., Dinis J., Rodrigues A., della Torre A. & Pinto J., 2013. Spatial analysis of a hybrid zone between cryptic ecological species of *Anopheles gambiae s.s.* in Guinea Bissau.

- EMBO Conference on molecular and population biology of mosquitoes and other disease vectors: from basic vector biology to disease control. *Pathogens and Global Health*, 107:400–457.
- Walker K., 2000. Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control. *Medical and Veterinary Entomology*, 14:345–354.
- Weetman D., Wilding C.S., Steen K., Pinto J. & Donnelly M.J., 2012. Gene flow-dependent genomic divergence between *Anopheles gambiae* M and S forms. *Molecular Biology and Evolution*, 29:279–291.
- Weill M., Chandre F., Brengues C., Manguin S., Akogbeto M., Pasteur N., Guillet P. & Raymond M., 2000. The *kdr* mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology*, 9: 451–455.
- Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P. & Raymond M., 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423:137–138.
- Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M. & Raymond M., 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, 13:1–7.
- White B.J., Lawniczak M.K., Cheng C., Coulibaly M.B., Wilson M.D., Sagnon N., Costantini C., Simard F., Christophides G.K. & Besansky N.J., 2011a. Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to *Plasmodium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:244–249.
- White B.J., Collins F.H. & Besansky N.J., 2011b. Evolution of *Anopheles gambiae* in relation to humans and malaria. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42:111–132.
- White G.B., 1985. *Anopheles bwambae* sp.n., a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *A.gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, 10:501–522.
- White G.B., 2003. Mosquitoes - Family Culicidae. In: *Manson's Tropical Disease*, Cook GC & Zumla AI (eds.) (21st ed.), Saunders Company, London: 1741–1762.

- WHO, 2006. *Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance*. World Health Organization, Geneva, pp. 141.
- WHO, 2012. Disponível em: www.anopheles-strasbourg.fr/whats-up/about-malaria/ [acesso a: 22 de Janeiro de 2014]
- WHO, 2012b. *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors*. World Health Organization, Geneva, pp. 130.
- WHO, 2013. *World Malaria Report 2013*. World Health Organization, Geneva, pp. 286.
- Wood O.R., Hanrahan S., Coetzee M., Koekemoer L.L. & Brooke B.D., 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors*, 3(67).
- Yotoko K. S. C. & Elisei C., 2006. Malaria parasites (Apicomplexa, Haematozoa) and their relationships with their hosts: is there an evolutionary cost for the specialization? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44:265–273.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da malária a nível mundial.....	2
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Plasmodium sp.</i>	4
Figura 3 – Ciclo de vida dos mosquitos do género <i>Anopheles</i>	5
Figura 4 – (A) - Principais diferenças entre anofelíneos e culicíneos nas várias etapas do ciclo de vida (B) - Anatomia geral de um mosquito fêmea adulto.....	7
Figura 5 – Distribuição geográfica dos membros do complexo <i>A. gambiae</i>	14
Figura 6 – Esquema da estrutura transmembranar do canal de sódio para-tipo (<i>voltage gated</i>).....	22
Figura 7 – Localização geográfica da República da Guiné-Bissau.....	30
Figura 8 – Mapa de cobertura do solo (FAO, 2009), com os locais das colheitas entomológicas.....	32
Figura 9 – Identificação de espécies do complexo <i>A. gambiae</i> , por IGS-PCR.....	35
Figura 10 – Resultados do SINE-PCR em <i>A. gambiae s.l.</i> demonstrando a presença ou ausência do polimorfismo de inserção nas espécies <i>A. coluzzii</i> e <i>A. gambiae</i> respetivamente.....	36
Figura 11 – Padrão de bandas numa eletroforese obtidas pelo PIRA-PCR na deteção de mutações <i>kdr</i>	38
Figura 12 – Padrão de bandas obtido pelo PCR-RFLP na deteção da mutação G119S.....	39
Figura 13 – Resultados da técnica de ELISA para determinação origem da refeição sanguínea.....	42
Figura 14 – Resultados da técnica de ELISA para deteção da proteína circunsporozoítica (CSP).....	44
Figura 15 – Distribuição das espécies do complexo <i>A. gambiae</i> na Guiné-Bissau.....	46
Figura 16 – Distribuição das frequências alélicas nos <i>loci kdr</i> e <i>ace-1</i> no complexo <i>A. gambiae</i>	49
Figura 17 – Origem da refeição sanguínea nas espécies amostradas em repouso no interior de habitações, na região litoral da Guiné-Bissau.....	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 –	Caraterísticas das localidades prospectadas.....	31
Tabela 2 –	Resultados obtidos pela comparação entre os marcadores IGS e SINE na identificação de <i>A. coluzzii</i> e <i>A. gambiae</i>	48
Tabela 3 –	Índices de antropofilia para <i>A. coluzzii</i> , <i>A. gambiae</i> e híbridos obtidos em colheitas em repouso no interior das habitações humanas.....	51
Tabela 4 –	Proporção de refeições sanguíneas por tipo de sangue em fêmeas colhidas no interior (IR) e no exterior (OR) das habitações.....	53
Tabela 5 –	Amostras analisadas por CSP-ELISA.....	53
Tabela 6 –	Valores de absorvância e <i>cut-off</i> para os resultados positivos por CSP-ELISA.....	54

ANEXOS

Tabela A1 –	Distribuição das espécies do complexo <i>A. gambiae</i> na Guiné-Bissau.....	87
Tabela A2 –	Frequências alélicas e distribuição genotípica das mutações <i>kdr</i> em <i>A. gambiae s.l.</i> nas localidades prospectadas na Guiné-Bissau	88
Tabela A3 –	Frequências genotípicas e do alelo 119S no gene <i>ace-1</i> de <i>A. gambiae s.l.</i> na Guiné-Bissau.....	91
Tabela A4 –	Preferências hemáticas de <i>A. gambiae s.l.</i> nas localidades da Guiné-Bissau, obtidas pela técnica de ELISA <i>Two-Site</i>	92

ANEXOS

Tabela A1 – Distribuição das espécies do complexo *A. gambiae* na Guiné-Bissau.

Região	Localidade	Latitude/Longitude	N	Espécies do complexo <i>A. gambiae</i>				
				<i>Ac</i>	<i>Ac / Ag</i>	<i>Ag</i>	<i>Aa</i>	<i>Am</i>
Litoral	Quinhame1	11,884222/-15,856500	132	9 (0,07)	31 (0,23)	51 (0,39)	0 (0,00)	41 (0,31)
	Prábis	11,802167/-15,738694	200	44 (0,22)	64 (0,32)	75 (0,38)	0 (0,00)	17 (0,09)
	Safim	11,956889/-15,649222	380	26 (0,07)	137 (0,36)	187 (0,49)	1 (0,01)	29 (0,08)
	Antula	11,891222/-15,581917	202	9 (0,04)	81 (0,40)	96 (0,48)	9 (0,04)	7 (0,03)
	Nhacra	11,960306/-15,537028	181	13 (0,07)	56 (0,31)	110 (0,61)	0 (0,00)	2 (0,01)
	Sub-Total		1095	101 (0,09)	369 (0,34)	519 (0,47)	10 (0,01)	96 (0,09)
Centro	Mansoa	12,076028/-15,321194	183	76 (0,42)	48 (0,26)	57 (0,31)	0 (0,00)	2 (0,01)
	Mandingará	12,171361/-15,192167	66	47 (0,71)	7 (0,11)	11 (0,17)	1 (0,02)	0 (0,00)
	Mansabá	12,289667/-15,170972	68	50 (0,74)	3 (0,04)	14 (0,21)	1 (0,01)	0 (0,00)
	Gambaná	12,051944/-14,902417	200	187 (0,94)	7 (0,04)	5 (0,03)	1 (0,01)	0 (0,00)
	Sub-Total		517	360 (0,69)	65 (0,12)	87 (0,17)	3 (0,01)	2 (0,01)
Interior	Comuda	12,198250/-14,628142	167	26 (0,16)	2 (0,01)	132 (0,79)	7 (0,04)	0 (0,00)
	Leibala	12,271750/-14,222444	297	3 (0,01)	6 (0,02)	284 (0,96)	4 (0,01)	0 (0,00)
	Canjufa	12,435139/-14,125500	41	2 (0,05)	3 (0,07)	36 (0,88)	0 (0,00)	0 (0,00)
	Sub-Total		505	31 (0,06)	11 (0,02)	452 (0,90)	11 (0,02)	0 (0,00)
	Total		2117	492 (0,23)	445 (0,21)	1058 (0,50)	24 (0,01)	98 (0,05)

Legenda: *N* – número de indivíduos; *Ac* – *A. coluzzii*; *Ag* – *A. gambiae*; *Aa* – *A. arabiensis*; *Am* – *A. melas*; *Ac/Ag* – híbridos; Para cada espécie são apresentados os números absolutos e as frequências relativas em parêntesis.

Tabela A2 – Frequências alélicas e distribuição genotípica das mutações *kdr* em *A. gambiae s.l.* nas localidades prospectadas na Guiné-Bissau.

	Local	Espécie	N	Alelos			Genótipos					
				f(1014L)	f(1014F)	f(1014S)	1014L	L1014F	1014F	L1014S	1014S	F1014S
Litoral	Quinhamel	<i>A. coluzzii</i>	9	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	51	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		híbridos	31	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>A. melas</i>	41	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	Prábis	<i>A. coluzzii</i>	44	0,989	0,011	-	0,977	0,023	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	75	0,987	0,013	-	0,973	0,027	-	-	-	-
		híbridos	64	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>A. melas</i>	17	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	Safim	<i>A. coluzzii</i>	18	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	98	0,990	0,010	-	0,990	-	0,010	-	-	-
		híbridos	87	0,994	0,006	-	0,989	0,011	-	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	1	0,500	-	0,500	-	-	-	1,000	-	-
		<i>A. melas</i>	8	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	Antula	<i>A. coluzzii</i>	7	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	72	0,986	0,014	-	0,972	0,028	-	-	-	-
		híbridos	67	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	9	0,111	0,111	0,778	-	-	-	0,222	0,556	0,222
		<i>A. melas</i>	6	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	Nhacra	<i>A. coluzzii</i>	12	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	83	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		híbridos	42	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>A. melas</i>	2	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	Sub-Total	<i>A. coluzzii</i>	90	0,994	0,006	-	0,989	0,011	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	379	0,992	0,008	-	0,987	0,011	0,003	-	-	-
		híbridos	291	0,998	0,002	-	0,997	0,003	-	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	10	0,150	0,100	0,750	-	-	-	0,300	0,500	0,200
		<i>A. melas</i>	74	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-

Legenda: N: número de indivíduos analisados; **1014L** – alelo selvagem TTA; **1014F** – alelo mutado TTT; **1014S** – alelo mutado TCA.

Tabela A2 (continuação) – Frequências alélicas e distribuição genotípica das mutações *kdr* em *A. gambiae* s.l. nas localidades prospectadas na Guiné-Bissau

Local	Espécie	N	Alelos			Genótipos					
			<i>f</i> (1014L)	<i>f</i> (1014F)	<i>f</i> (1014S)	1014L	L1014F	1014F	L1014S	1014S	F1014S
Mansoa	<i>A. coluzzii</i>	63	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	53	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	híbridos	44	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. melas</i>	2	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
Mandingará	<i>A. coluzzii</i>	47	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	11	0,909	0,091	-	0,909	-	0,091	-	-	-
	híbridos	7	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	1	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Centro Mansabá	<i>A. coluzzii</i>	50	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	14	0,250	0,750	-	0,214	0,071	0,714	-	-	-
	híbridos	3	0,500	0,500	-	0,333	0,333	0,333	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	1	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gambaná	<i>A. coluzzii</i>	187	0,995	0,005	-	0,995	-	0,005	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	5	0,700	0,300	-	0,400	0,600	-	-	-	-
	híbridos	7	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	1	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sub-Total	<i>A. coluzzii</i>	347	0,997	0,003	-	0,997	-	0,003	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	83	0,843	0,157	-	0,819	0,048	0,133	-	-	-
	híbridos	61	0,975	0,025	-	0,967	0,016	0,016	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	3	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
	<i>A. melas</i>	2	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-

Legenda: N: número de indivíduos analisados; **1014L** – alelo selvagem TTA; **1014F** – alelo mutado TTT; **1014S** – alelo mutado TCA.

Tabela A2 (continuação) – Frequências alélicas e distribuição genotípica das mutações *kdr* em *A. gambiae* s.l. nas localidades prospectadas na Guiné-Bissau.

	Local	Espécie	N	Alelos			Genótipos					
				f(1014L)	f(1014F)	f(1014S)	1014L	L1014F	1014F	L1014S	1014S	F1014S
Interior	Comuda	<i>A. coluzzii</i>	26	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	130	0,046	0,954	-	-	0,092	0,908	-	-	-
		híbridos	2	-	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	7	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leibala	<i>A. coluzzii</i>	2	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	166	0,045	0,955	-	0,012	0,066	0,922	-	-	-
		híbridos	3	-	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	4	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Canjufa	<i>A. coluzzii</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	26	0,077	0,923	-	-	0,154	0,846	-	-	-
		híbridos	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sub-Total	<i>A. coluzzii</i>	28	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	322	0,048	0,952	-	0,006	0,084	0,747	-	-	-
		híbridos	5	-	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	11	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-
		<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total	<i>A. coluzzii</i>	465	0,997	0,003	-	0,996	0,002	0,002	-	-	-
		<i>A. gambiae</i>	784	0,589	0,411	-	0,566	0,045	0,389	-	-	-
		híbridos	357	0,980	0,020	-	0,978	0,006	0,017	-	-	-
		<i>A. arabiensis</i>	24	0,646	0,042	0,313	0,583	-	-	0,125	0,208	0,083
		<i>A. melas</i>	76	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-

Legenda: N: número de indivíduos analisados; **1014L** – alelo selvagem TTA; **1014F** – alelo mutado TTT; **1014S** – alelo mutado TCA.

Tabela A3 – Frequências genotípicas e do alelo 119S no gene *ace-1* de *A. gambiae s.l.* na Guiné-Bissau.

	Local	N	<i>A. coluzzii</i>		<i>A. gambiae</i>		híbridos		<i>A. arabiensis</i>		<i>A. melas</i>	
			119G	G119S	119G	G119S	119G	G119S	119G	G119S	119G	G119S
Litoral	Quinhamel	132	9 (1,00)	-	51 (1,00)	-	31 (1,00)	-	0 (0,00)	-	41 (1,00)	-
	Prábis	199	44 (1,00)	-	75 (1,00)	-	64 (1,00)	-	0 (0,00)	-	16 (1,00)	-
	Safim	212	18 (1,00)	-	98 (1,00)	-	87 (1,00)	-	1 (1,00)	-	8 (1,00)	-
	Antula	180	8 (1,00)	-	80 (1,00)	-	77 (1,00)	-	9 (1,00)	-	6 (1,00)	-
	Nhacra	139	12 (1,00)	-	83 (1,00)	-	42 (1,00)	-	0 (0,00)	-	2 (1,00)	-
Centro	Mansoa	162	63 (1,00)	-	53 (1,00)	-	44 (1,00)	-	0 (0,00)	-	2 (1,00)	-
	Mandingará	66	47 (1,00)	-	11 (1,00)	-	7 (1,00)	-	1 (1,00)	-	0 (0,00)	-
	Mansabá	68	50 (1,00)	-	11 (0,79)	3 (0,21) (0,11)§	3 (1,00)	-	1 (1,00)	-	0 (0,00)	-
	Gambana	200	187 (1,00)	-	5 (1,00)	-	7 (1,00)	-	1 (1,00)	-	0 (0,00)	-
	Comuda	167	26 (1,00)	-	127 (0,96)	5 (0,04) (0,02)§	2 (1,00)	-	7 (1,00)	-	0 (0,00)	-
Interior	Leibala	175	2 (1,00)	-	158 (0,95)	8 (0,05) (0,03)§	3 (1,00)	-	4 (1,00)	-	0 (0,00)	-
	Canjufa	26	0 (0,00)	-	24 (0,92)	2 (0,08) (0,04)§	0 (0,00)	-	0 (0,00)	-	0 (0,00)	-
	TOTAL	1726	466 (1,00)	-	776 (0,98)	18 (0,02) (0,01)§	367 (1,00)	-	24 (1,00)	-	75 (1,00)	-

Legenda: N: número de indivíduos analisados; **119G** – homozigótico suscetível; **G119S** – heterozigótico; frequências genotípicas em parêntesis; § - frequência do alelo mutado.

Tabela A4 – Preferências hemáticas de *A. gambiae s.l.* nas localidades da Guiné-Bissau, obtidas pela técnica de ELISA *Two-Site*.

Local	Espécie	N	Humano	Bovino	Caprino	Ave	Canino	Humano/Bovino	Humano/Canino	Humano/Caprino	Bovino/Caprino	Bovino/Canino	Negativo
Safim (IR)	<i>A. coluzzii</i>	12	5 (0,42)	5 (0,42)	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (0,16)
	<i>A. gambiae</i>	106	28 (0,26)	43 (0,40)	4 (0,04)	1 (0,01)	4 (0,04)	-	-	-	-	2 (0,02)	24 (0,23)
	híbridos	80	14 (0,18)	40 (0,50)	3 (0,04)	-	2 (0,03)	1 (0,01)	1 (0,01)	1 (0,01)	-	-	18 (0,23)
	<i>A. melas</i>	11	2 (0,18)	8 (0,73)	1 (0,09)	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Safim (OR)	<i>A. coluzzii</i>	3	-	3 (1,00)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	35	-	34 (0,97)	-	-	-	-	-	-	1 (0,03)	-	-
	híbridos	21	1 (0,05)	19 (0,90)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,05)
	<i>A. melas</i>	11	-	10 (0,91)	-	-	-	1 (0,09)	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antula	<i>A. coluzzii</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	6	3 (0,50)	-	1 (0,17)	-	-	-	-	-	-	-	2 (0,33)
	híbridos	2	1 (0,50)	1 (0,50)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nhacra	<i>A. coluzzii</i>	1	1 (1,00)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	30	27 (0,90)	-	2 (0,07)	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,03)
	híbridos	15	14 (0,93)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,07)
	<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: *N* – número de indivíduos analisados em cada localidade; **IR**: colheitas no interior das habitações; **OR**: colheitas no exterior; frequências apresentadas em parêntesis.

Tabela A4 (continuação) – Preferências hemáticas de *A. gambiae* s.l. nas localidades da Guiné-Bissau, obtidas pela técnica de ELISA *Two-Site*.

Local	Espécie	N	Humano	Bovino	Caprino	Ave	Canino	Humano/Bovino	Humano/Canino	Humano/Caprino	Bovino/Caprino	Bovino/Canino	Negativo
Mansoa	<i>A. coluzzii</i>	17	14 (0,82)	-	-	-	1 (0,06)	-	-	-	-	2 (0,12)	-
	<i>A. gambiae</i>	9	7 (0,78)	-	1 (0,11)	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,11)
	híbridos	7	5 (0,72)	-	1 (0,14)	-	1 (0,14)	-	-	-	-	-	-
	<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leibala	<i>A. coluzzii</i>	1	1 (1,00)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	148	145 (0,97)	-	-	-	-	-	1 (0,01)	1 (0,01)	-	-	1 (0,01)
	híbridos	3	3 (1,00)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	1	1 (1,00)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canjufá	<i>A. coluzzii</i>	2	2 (1,00)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. gambiae</i>	22	20 (0,92)	-	-	-	1 (0,04)	-	-	1 (0,04)	-	-	-
	híbridos	3	3 (1,00)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. melas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. arabiensis</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: N – número de indivíduos analisados em cada localidade; **IR:** colheitas no interior das habitações; **OR:** colheitas no exterior; frequências apresentadas em parêntesis.